



Universidade de Aveiro
Ano2013

Departamento de Química

Bruno Miguel
Marques Godinho

**Microrreatores – uma ferramenta para a
otimização de bioprocessos**



Universidade de Aveiro
Ano2013

Departamento de Química

Bruno Miguel
Marques Godinho

Microrreatores – uma ferramenta para a otimização de bioprocessos

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo de Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor Artur Jorge de Faria Ferreira, Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Águeda.

Dedico este trabalho à minha Mãe e restante família, que contribuíram para esta etapa da minha vida.

o júri

Presidente

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal
Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dr.^a Ana Paula Mora Tavares
Investigadora auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

agradecimentos

Agradeço:

À Prof.^a Dr.^a Luísa Serafim Leal e ao Prof. Dr. Artur Ferreira toda a orientação e suporte ao longo deste trabalho.

Ao Francisco Gomes que durante a primeira fase deste trabalho me acompanhou no laboratório com total dedicação e empenho. Também a ele se devem parte dos resultados obtidos.

À Eng.^a Ana Caço a ajuda prestada no laboratório durante todo o trabalho.

À Técnica Superior Maria Celeste Azevedo pela ajuda essencial nas análises por FTIR.

Ao Ricardo Pinto a disponibilidade, paciência e cuidado com que recolheu as imagens por SEM.

A todos os outros elementos do lab. 29.1.16 a disponibilidade e ajuda prestada. Deixo um agradecimento especial à Fátima Sousa que me acompanhou nas análises finais.

À Belinda Soares o apoio na fase inicial do trabalho e o material cedido.

À Ana Francisca que gentilmente me emprestou os frascos de vidro que serviram de microrreatores.

A todos os meus amigos, colegas e familiares que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta etapa fosse mais fácil. Deixo um especial obrigado ao Emanuel e à Liliana pelo apoio e camaradagem em todos os momentos.

palavras-chave

microrreator, lipase B da *Candida antarctica*, imobilização enzimática, celulose bacteriana, eugenil benzoato, propil galato

resumo

O trabalho iniciou-se com uma pesquisa bibliográfica sobre os microrreatores, a sua aplicação em processos enzimáticos, suportes, tipos de imobilização enzimática e sínteses de ésteres em meios não convencionais catalisadas por lipases.

A primeira fase laboratorial iniciou com a obtenção das melhores condições de imobilização de lipase B da *Candida antarctica* (CALB) em celulose bacteriana (CB), tendo como variáveis a concentração enzimática e o tempo de contacto entre a solução e a CB. Estas condições ótimas foram seleccionadas para imobilização por adsorção e por ligação covalente. As condições escolhidas foram a concentração de 4mg/mL com um tempo de exposição de 4 horas.

Numa segunda fase foi testada a estabilidade operacional das imobilizações em meio aquoso, através da atividade enzimática em vários ciclos de utilização (hidrólise *p*-nitrofenol). No teste de estabilidade foram distinguidos dois grupos de imobilizações: as armazenadas no frigorífico (4°C) e as armazenadas no congelador (-18°C) para ambos os tipos de imobilização. As imobilizações do congelador apresentaram melhor resistência operacional. Não foi notada uma diferença significativa entre os dois tipos de imobilização, embora a adsorção tenha sido melhor nos primeiros ciclos e a ligação covalente ligeiramente superior nos ciclos finais.

Na parte final, usando a imobilização por adsorção, foi tentada, sem sucesso, a síntese de dois ésteres, nomeadamente o propil galato e o eugenil benzoato, por serem duas moléculas com grande potencial de aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentar. No entanto foi possível encontrar um método simples e rápido de deteção e análise dos ésteres por FTIR usando padrões. Foi também possível constatar que o propil galato e ácido gálico podem ser rapidamente detetados por titulação com hidróxido de sódio (sem indicador extra) através das diferentes cores que apresentam, amarelo e verde respetivamente.

keywords

microrreactor, *Candida antarctica* lipase B, enzyme immobilization, bacterial cellulose, eugenyl benzoate, propyl gallate

abstract

The work began with a bibliographical research on the microrreactors, its application in enzymatic processes, supports, types of enzyme immobilization and syntheses of esters in non-conventional medium catalyzed by lipases.

The first laboratorial phase began obtaining the best conditions of immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) at bacterial cellulose (BC). The variables was enzyme concentration and the contact time between the solution and the BC. These optimum conditions were selected for immobilization by adsorption and by covalent bond. The conditions chosen were the concentration of 4mg/mL with an exposure time of 4 hours.

In a second phase was tested the operational stability of the immobilizations in an aqueous medium, by enzymatic activity in several cycles of utilization (hydrolysis *p*-nitrophenol). In the stability test were distinguished two groups of immobilizations: the stored in the fridge (4°C) and stored in the freezer (-18°C) for both types of immobilization. Freezer immobilizations presented best operating resistance. It was not noticed a significant difference between the two types of immobilization, although the adsorption has been better in the first cycles and the covalent bond slightly higher than in the final cycles.

In the final part, using the adsorption, it was attempted, without success, the synthesis of two esters, in particular the propyl gallate and eugenil benzoate, because they are two molecules with great potential for application in the pharmaceutical and food industries. However, it was possible to find a simple and rapid method for detection and analysis of esters by FTIR, using patterns. It was also found that the propyl gallate and gallic acid can be quickly detected by titration with sodium hydroxide (without extra indicator), through the different colours present, yellow and green respectively.

Índice

ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	VII
1. INTRODUÇÃO AO TRABALHO E OBJETIVOS.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Microrreatores enzimáticos	3
2.2. Aplicações de monitorização e estudos cinéticos	4
2.3. Imobilização Enzimática.....	6
2.4. Tipos de imobilização.....	6
2.4.1. Física	6
2.4.2. Química	7
2.5. Meio reacional.....	9
2.6. Lipases.....	13
2.6.1. Lipase B da <i>Candida antarctica</i>	13
2.7. Imobilização de lipases em celulose	15
2.8. Esterificações catalisadas por lipases.....	16
2.8.1. Ésteres Eugenólicos (Eugenil benzoato, caprilato e acetato).....	17
2.8.2. Propil Galato.....	20
2.8.3. Isopropil acetato	22
2.8.4. 2-etilhexil palmitato.....	23
2.8.5. Esterificações em reatores de fluxo contínuo	26
2.9. Conclusão	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Materiais	29
3.2. Enzima	29

3.3.	Suporte de imobilização	29
3.4.	Imobilização enzimática.....	30
3.4.1.	Adsorção.....	30
3.4.2.	Ligação covalente	30
3.5.	Quantificação de proteína total	31
3.6.	Determinação da atividade enzimática	31
3.6.1.	Reta de calibração do <i>p</i> -nitrofenol.....	32
3.6.2.	Atividade da enzima livre	32
3.6.3.	Atividade da enzima imobilizada	32
3.7.	Lavagem das imobilizações (quantificação de proteína perdida).....	33
3.8.	Teste de retenção de soluções na celulose bacteriana	34
3.9.	Análise à estrutura da celulose bacteriana	34
3.9.1.	Microscopia eletrônica de varrimento (<i>SEM-Scanning Electron Microscopy</i>).....	34
3.9.2.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (<i>FTIR-Fourier transform infrared spectroscopy</i>)	34
3.10.	Esterificações em meio não convencional (Eugenil benzoato e Propil galato)	35
3.11.	Análise dos ésteres formados	36
3.11.1.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (<i>FTIR-Fourier transform infrared spectroscopy</i>)	36
3.12.	Cálculos	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Imobilização de lipase B da <i>Candida antarctica</i> em celulose bacteriana	37
4.1.1.	Proteína imobilizada	37
4.1.2.	Proteína libertada na lavagem.....	38
4.1.3.	Quantidade de proteína imobilizada	39
4.2.	Atividade enzimática.....	40
4.2.1.	Influência do pH na quantificação de <i>p</i> -nitrofenol	40
4.2.2.	Enzima livre.....	41
4.2.3.	Enzima imobilizada	43
4.3.	Quantificação da proteína perdida nos ciclos de lavagem.....	50
4.4.	Teste retenção de soluções em celulose bacteriana	52
4.5.	Análise estrutural da celulose bacteriana	53
4.5.1.	Análise por SEM	53
4.5.2.	Espectro FTIR-ATR da celulose bacteriana nos diferentes estados	55

4.6. Síntese dos ésteres (eugenil benzoato e propil galato)	57
4.6.1. Eugenil benzoato	57
4.6.2. Propil galato.....	61
4.6.3. Atividade dos suportes enzimáticos após meio não convencional.....	69
 5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO	 71
 6. BIBLIOGRAFIA	 73
 7. ANEXOS.....	 77
Anexo A- Ficha para preparação de soluções	77
Anexo B- Cálculo da atividade (UI) no microrreator	79
Anexo C- Quantificação da proteína na solução comercial de CALB	81
Anexo D- Reta calibração do eugenol	82
Anexo E- Espectros FTIR complementares	83
Anexo F- Fotos dos microrreatores, imobilizações e titulações	86

Abreviaturas

Abreviaturas	Significado português	Inglês
ATR	Reflectância total atenuada	<i>Attenuated total reflectance</i>
CALA	Lipase A da <i>Candida antarctica</i>	<i>Candida antarctica lipase A</i>
CALB	Lipase B da <i>Candida antarctica</i>	<i>Candida antarctica lipase B</i>
CB	Celulose bacteriana	-
CLCE	Enzimas interligadas em estrutura cristalina	<i>Cross-linked crystalline enzymes</i>
CLE	Enzimas interligadas	<i>Cross-linked enzymes</i>
CLEA	Enzimas interligadas por agregados	<i>Cross-linked enzymes aggregated</i>
CLSDE	Enzimas desidratadas interligadas	<i>Cross-linked spray-dried enzymes</i>
FTIR	Espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
G	Conservação no congelador	-
LU	Unidades de atividade da lipase (μmol/min)	<i>Lipase units (μmol/min)</i>
R²	Coeficiente de correlação	-
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento	<i>Scanning electron microscopy</i>
U, IU, UI	Unidade de atividade enzimática (μmol/min)	-

Índice de figuras

Figura 1- <i>Lab-on-a-chip</i> microeletrónico [7].	4
Figura 2-Esquema representativo dos diferentes tipos de imobilização [1].	9
Figura 3-Exemplos moléculas sintetizadas com sucesso usando CALB como catalisador. Ésteres: A, B, C, D, G, H. Amida: E. Carbamato: F [15,17].	14
Figura 4-Síntese do Eugenil benzoato [28].	18
Figura 5-Síntese de Eugenil caprilato [30].	19
Figura 6-Síntese do propil galato.	21
Figura 7-Rendimento da síntese de propil galato em função do tempo, para enzima imobilizada e livre nas condições ideais [33].	21
Figura 8-Síntese do Isopropil acetato [36].	22
Figura 9-Estudo da capacidade de reutilização do sistema biocatalítico nas condições ideais [36].	23
Figura 10-Representação molecular do 2-etilhexil palmitato.	23
Figura 11-Reator de membranas com agitador de 6 pás planas, usado por Tan et al. (2005) [37].	24
Figura 12-Estabilidade da enzima imobilizada ao longo das reutilizações nas condições ideais [37].	25
Figura 13-Ilustração do sistema de fluxo contínuo [6].	26
Figura 14-Síntese de feniletil cafeato em fluxo contínuo com banho de ultrassons [6].	27
Figura 15-CB inteira e recortada (célula de quartzo 1cm)	30
Figura 16-Retenção relativa (%) de CALB em CB.	37
Figura 17-Libertação relativa (%) de CALB na lavagem.	38
Figura 18-Massa de CALB (mg) retida na CB após lavagem.	39
Figura 19-Hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil acetato catalisada por CALB.	40
Figura 20-Atividade da CALB livre (não diluída). Absorvência em função do tempo.	41
Figura 21-Atividade enzimática (UI) das imobilizações ao longo dos ciclos e velocidade da reação natural de formação de <i>p</i> -nitrofenol com e sem CB, num microrreator de 5mL.	43
Figura 22-Atividade residual (%) ao longo dos ciclos.	45
Figura 23-Atividade (UI/mg CB) em função dos dias de armazenamento até ao 1º ciclo, para as 3 réplicas de cada imobilização.	49
Figura 24-Quantidade de CALB (µg) ativa imobilizada ao longo dos ciclos.	51
Figura 25-Esquerda: fibras de CB não oxidadas. Direita: fibras de CB oxidadas.	53
Figura 26-Esquerda: superfície de CB não oxidada. Direita: superfície de CB oxidada.	54
Figura 27-Superfícies CB-Esquerda: imobilização por adsorção. Direita: imobilização por ligação covalente.	54
Figura 28-Esquerda: superfície CB oxidada. Direita: superfície após imobilização por ligação covalente.	54
Figura 29-CB não oxidada com vista para o interior e à superfície.	55
Figura 30-Espectros FTIR-ATR das amostras de CB normal, oxidada e após imobilização por adsorção e ligação covalente.	56
Figura 31-Síntese do Eugenil benzoato.	57
Figura 32-Espectro FTIR do padrão eugenil benzoato.	58

Figura 33-Espectro FTIR do branco da reação 3 de síntese eugenil benzoato (solução de ácido benzoico e eugenol em heptano).	59
Figura 34-Espectro FTIR da reação 3 de síntese eugenil benzoato com enzima livre.	59
Figura 35-Espectro FTIR da reação 3 de síntese eugenil benzoato com enzima imobilizada.	60
Figura 36-Espectro FTIR do branco da reação 4 de síntese eugenil benzoato (solução de ácido benzoico em eugenol).....	60
Figura 37-Espectro FTIR da reação 4 de síntese eugenil benzoato.....	61
Figura 38-Síntese do propil galato.....	61
Figura 39-Espectro do padrão propil galato obtido por FTIR-ATR.....	64
Figura 40-Espectro do padrão propil galato obtido por FTIR.	65
Figura 41-Espectro FTIR do branco da reação 2 de síntese propil galato (solução de ácido gálico em heptano/propanol).....	66
Figura 42- Espectro FTIR da reação 2 de síntese propil galato com enzima livre.....	66
Figura 43- Espectro FTIR da reação 2 de síntese propil galato com enzima imobilizada.	67
Figura 44-Espectros FTIR de propil galato sintetizado (a) e padrão de propil galato (b) [49].	68
Figura 45-Espectro FTIR de propil galato sintetizado [33].	68
Figura 46- Reta calibração do <i>p</i> -nitrofenol pH (7,2).....	79
Figura 47- Representação das amostras do meio reacional ao longo de um ciclo, absorvência e concentração respectivas.....	80
Figura 48-Reta calibração de proteína.	81
Figura 49-Reta calibração do eugenol.....	82
Figura 50-Espectro FTIR-ATR no <i>p</i> -nitrofenil acetato, com picos assinalados.	83
Figura 51-Espectro FTIR do ácido benzoico [46].....	83
Figura 52-Espectro FTIR do eugenol [46].	84
Figura 53-Espectro FTIR do éster lauril galato [46].	84
Figura 54-Espectros FTIR do ácido gálico (A) e nanopartículas de ouro (B) [50].	85
Figura 55-Microrreatores: Célula de quarto (1cm), frasco de imobilizações e frasco de reações. ..	86
Figura 56-CB usada (tirada de frigorífico), CB nova com imobilização, CB nova sem imobilização.	86
Figura 57-Reação hidrólise <i>p</i> -nitrofenil acetato com CALB imobilizada em CB.	86
Figura 58-Solução de ácido gálico ao longo da titulação com NaOH até equilíbrio (cor verde).....	87
Figura 59-Solução de propil galato titulada com NaOH no equilíbrio (amarelo), com excesso (laranja).	87

Índice de tabelas

Tabela 1-Vantagens e desvantagens da utilização de solventes orgânicos [11].	11
Tabela 2-Critérios para a escolha de um solvente orgânico [11].	11
Tabela 3-Exemplos de processos estabelecidos a nível industrial [11].	12
Tabela 4-Efeito da quantidade de enzima utilizada na síntese de isopropil acetato em ausência de agente secante e com as restantes condições ideais [36].	23
Tabela 5-Relação entre a quantidade de enzima utilizada, número de reutilizações do suporte catalítico e respectivas atividades [37].	25
Tabela 6-Reações testadas em diferentes condições na tentativa de síntese de eugenil benzoato e propil galato.	35
Tabela 7-Retas de calibração de <i>p</i> -nitrofenol com diferentes pHs.	41
Tabela 8-Atividade específica da CALB à temperatura ambiente.	42
Tabela 9-Número de vezes que as imobilizações superaram a velocidade da reação não catalisada (natural).	46
Tabela 10-Quantidade de proteína (µg) perdida nos ciclos de lavagem.	51
Tabela 11-Massa da CB antes e depois da retenção das soluções e após desidratação.	53
Tabela 12-Condições testadas na síntese de eugenil benzoato.	57
Tabela 13- Condições testadas na tentativa de síntese de propil galato.	62
Tabela 14-Atividade das imobilizações (UI) após meio não convencional e nº de vezes que superou a velocidade da reação não catalisada.	69
Tabela 15- Concentração de proteína na solução comercial de CALB.	81

1. Introdução ao trabalho e objetivos

Atualmente, uma das preocupações fundamentais da indústria é reduzir a pegada ecológica através da otimização e/ou substituição de processos químicos tradicionais por bioprocessos. Desta forma, pretende-se diminuir a quantidade de poluentes gerados substituindo os recursos não renováveis por recursos renováveis e facilmente recicláveis.

Os microrreatores são uma forma económica de testar e otimizar reações pela reduzida utilização de recursos. A miniaturização de reatores, aliada à otimização de processos utilizando biocatalisadores, permitirá reduzir nas indústrias farmacêuticas e químicas o impacto ambiental das suas atividades. Por esta razão, a investigação na área dos microrreatores tem vindo a aumentar, principalmente na aplicação de catalisadores “verdes” como enzimas e microrganismos no desenvolvimento de novos produtos ou na substituição de processos químicos.

Neste trabalho, utilizou-se a lipase B da *Candida antartica* (CALB), testando a sua imobilização em celulose bacteriana (CB) por adsorção e por ligação covalente.

A CALB é utilizada nas várias áreas da indústria como catalisador de reações (indústria farmacêutica) ou mesmo como parte integrante de um produto final (indústria alimentar).

Os principais objetivos deste trabalho consistiram em otimizar a imobilização de CALB em CB, por adsorção e por ligação covalente, testar a estabilidade operacional das imobilizações com diferentes condições de conservação e sintetizar dois ésteres de valor acrescentado (eugenil benzoato e propil galato), em microrreator, com a imobilização mais estável. Assim, começou-se por otimizar o processo de imobilização em CB testando as condições do tempo de exposição e concentração da solução enzimática. Escolheram-se as condições que permitiram imobilizar a maior quantidade de CALB em CB, para cada um dos tipos de imobilização. Em seguida, formaram-se dois grupos de imobilizações com diferentes temperaturas de conservação (refrigerador (4°C) e congelador (-18°C)). Testou-se a estabilidade operacional das imobilizações através da realização de ciclos sucessivos de hidrólise do éster *p*-nitrofenil acetato, em microrreator, com medição da atividade enzimática. Por fim, e com a imobilização mais estável, realizaram-se algumas tentativas de síntese de cada um dos ésteres separadamente, com diferentes temperaturas, meios de

reação e proporções dos reagentes. No final, analisaram-se os meios reacionais para verificar a formação dos ésteres. Em paralelo, analisou-se a estrutura da CB antes e depois da imobilização por adsorção e por ligação covalente, com o objetivo de verificar as alterações causadas na CB pelos processos de imobilização.

No capítulo 2 deste trabalho apresenta-se uma revisão bibliográfica com considerações relevantes para o desenvolvimento do mesmo, dando particular destaque à utilização de lipases imobilizadas em microrreatores. No capítulo 3 descrevem-se o trabalho experimental com exposição dos materiais e métodos utilizados. No capítulo 4 apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos. Por fim, no capítulo 5 apresentam-se as conclusões finais do trabalho e algumas sugestões para desenvolver no futuro.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Microrreatores enzimáticos

Os processos biológicos apresentam várias vantagens quando comparados com os processos químicos tradicionais, nomeadamente a nível ambiental e económico. Sempre que possível são adotados nos diferentes ramos da indústria química, alimentar e farmacêutica, particularmente em processos de química fina onde é necessária uma elevada especificidade [1,2]. Contudo, poucos processos enzimáticos têm sido aplicados comercialmente devido aos elevados custos de implementação, problemas com a estabilidade e eficiência das reações [1,3]. A conjugação dos processos de biotransformação e a tecnologia de microrreatores tem um grande potencial para promover o desenvolvimento de mais processos enzimáticos à escala industrial [1].

Os primeiros microrreatores enzimáticos foram construídos entre as décadas de 70 e 80 do século passado. Todavia, a sua utilização em aplicações práticas surgiu apenas nos anos 90. No início, desenvolveram-se com o intuito de facilitar o trabalho de rotina em análises bioquímicas, e apenas mais tarde surgiram aplicações em estudos cinéticos e monitorização biocatalítica, que vieram mostrar vantagens assinaláveis face aos ensaios clássicos em descontinuo [1].

Os microrreatores enzimáticos têm sido testados tanto com enzimas em solução como com enzimas imobilizadas. A grande parte das aplicações descritas na literatura centra-se no uso de enzimas imobilizadas, que dispensam o fornecimento contínuo de biocatalisador durante o processo [1]. Muitos métodos disponíveis para imobilização em suportes podem ser aplicados em enzimas ou em células [4]. Basicamente, as técnicas mais utilizadas envolvem o aprisionamento do biocatalisador numa matriz porosa ou em esferas porosas de vários materiais, ligações covalentes nas superfícies mediadas por grupos funcionais [1,4,5] e a formação de membranas dentro de microcanais para imobilização enzimática [1]. Os substratos são normalmente movidos pela agitação, mas no caso de reatores que operam em contínuo com sistemas empacotados de microcanais é aplicada alta pressão [6], ou em alternativa fluxo electro osmótico [1].

2.2. Aplicações de monitorização e estudos cinéticos

O desafio mais importante para a engenharia de enzimas é a habilidade de gerar biocatalisadores eficientes, rapidamente e a custos razoáveis. A escassez de enzimas em quantidade, e os preços elevados dos reagentes e cofatores representam a maior dificuldade para o desenvolvimento da biocatálise. Assim sendo, é fundamental explorar e desenvolver técnicas para um desenvolvimento racional de melhores biocatalisadores em microescala, e realizar testes de monitorização antes de avançar para otimizações em grande escala [1].

A caracterização de enzimas pode ser facilitada usando sistemas miniaturizados de fluxo contínuo com monitorização constante em tempo real (*lab-on-a-chip*) [1,7].

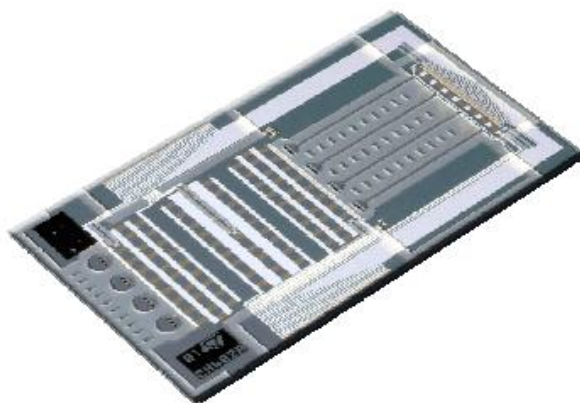


Figura 1-Lab-on-a-chip microeletrónico [7].

Estes sistemas são passíveis de ser automatizados rapidamente, superando problemas que surgem nos ensaios em batelada, como a dificuldade em fazer interagir os suportes contendo as enzimas com a solução substrato [1]. Os microrreatores facilitam a determinação de parâmetros chave, caracterizando a cinética de enzimas livres ou imobilizadas. Os *microchips* permitem operações em paralelo de várias reações enzimáticas com elevado rigor de monitorização dos biocatalisadores e substratos [1]. Não só as atividades individuais de cada enzima podem ser testadas, mas também os efeitos de inibidores ou potenciadores. Este tipo de abordagem permite também uma rápida e razoavelmente económica forma de otimizar as condições dos processos (pH, temperatura, tempo de retenção, etc). Contudo, para que este tipo de estratégia seja útil, as condições ótimas de reação encontradas usando microrreatores, têm de ser convenientemente transpostas para o processo em escala industrial, o que não é propriamente simples, pois propriedades físicas como a agitação e o transporte de massa podem ser significativamente diferentes, dificultando a comparação entre as diferentes escalas do processo [1].

É de notar, que os microrreatores de síntese enzimática continuam a ser uma área relativamente inexplorada. Apenas alguns casos são conhecidos com enzimas imobilizadas ou livres, sendo na sua grande maioria reações de hidrólise [3]. Várias reações testadas em sistema de microcanais tiveram rendimentos superiores face aos processos descontínuos, o que demonstra a possibilidade de microrreatores de fluxo contínuo poderem ser uma ferramenta importante para o desenvolvimento de processos [1,6]. Até ao momento são escassas as patentes que descrevem a construção de microrreatores enzimáticos, até 2011 eram 300 [1]. As publicações indicam que este campo se mantém na fase inicial de desenvolvimento, mas com os esforços atuais dirigidos ao desenvolvimento, otimização e aplicação deste tipo de microrreatores surgirá uma nova era no processamento bioquímico [1]. Uma das aplicações mais desenvolvidas é o uso de microrreatores enzimáticos para a hidrólise de gorduras usadas e a sua conversão em biodiesel [3].

Os microrreatores também têm potencial para ser utilizados para síntese à escala industrial, pois podem ser facilmente incorporados em sistemas para operarem como subunidades em grande número, sendo no final reunido todo o produto produzido por cada um deles. Este modelo de aumento de escala traz vantagens, porque as propriedades dos fluidos, transporte e dinâmica são preservadas, não sendo necessários ajustes significativos [1]. Neste caso, a manutenção é mais fácil e prática, pois para realizar a substituição ou manutenção de um microrreator, não é necessário parar todo o sistema, logo as perdas de produção e performance não são significativas [1]. Outra possibilidade de pesquisa nesta área é o desenvolvimento de reações multi-enzimáticas [1], mimetizando e manipulando caminhos metabólicos em *microchips* com o intuito de desenvolver biotransformações de alto rendimento. Para se atingir este objetivo, enzimas que funcionam em série têm de ser funcionais em *microchips* (*lab-on-a-chip*), sendo o produto de uma enzima o substrato para a seguinte, e assim sucessivamente, até se atingir o produto final desejado. A performance de reações bi e até trienzimáticas já foi demonstrada em *microchip* de vidro com um volume 0,09µL [1]. Isto pode facilitar a monitorização e compreensão dos vários passos enzimáticos e favorecer estudos futuros de engenharia metabólica. Além disso, a integração das biotransformações em vários passos nestes sistemas de microcanais pode favorecer a produtividade e isolamento do produto final [1].

2.3. Imobilização Enzimática

As enzimas estão amplamente difundidas na indústria, pois acrescentam diversas vantagens técnicas como a elevada especificidade, condições de reação mais suaves e biocompatibilidade [3]. As inúmeras enzimas existentes possuem características particulares que as distinguem, o que as torna úteis para as mais variadas aplicações, desde que bem selecionadas e utilizadas de acordo com condições específicas, nomeadamente: procedimentos de isolamento e purificação, estabilidade estrutural, sensibilidade a ligeiras alterações nas condições ótimas (pH, temperatura, oligo elementos e força iónica) e a elevada solubilidade em meios aquosos [1,4]. A imobilização enzimática permite resolver muitas destas limitações operacionais. A imobilização consiste num confinamento físico ou químico das enzimas num suporte sólido ou semi-sólido que preserva a sua atividade biocatalítica máxima [1,3,4,8]. Em resultado da imobilização, obtém-se um sistema catalítico heterogéneo mais robusto e económico, que permite a realização de operações contínuas e repetitivas [3]. Para garantir a preservação do poder biocatalítico pleno, os grupos funcionais do centro ativo da enzima não podem estar envolvidos na reação de imobilização e a estrutura terciária não deve estar alterada, significativamente, após a imobilização [1]. A imobilização enzimática oferece muitas vantagens técnicas aos processos quando comparada com os métodos tradicionais de suspensão enzimática no meio [3]. As enzimas imobilizadas podem ser facilmente recuperadas e reutilizadas várias vezes independentemente do tipo de reator (batelada ou contínuo). Além do mais, com um sistema catalítico imobilizado o controlo do processo é simplificado. Por fim, a imobilização pode potenciar a estabilidade estrutural, térmica e de pH, que permite a extensão do tempo de operação e vida da enzima [1,3].

2.4. Tipos de imobilização

De acordo com a força interativa da ligação enzima-suporte, a imobilização pode ser física (adsorção e aprisionamento) ou química (ligações covalentes) [1,3-5].

2.4.1. Física

A adsorção enzimática envolve a adesão da enzima à superfície ativa de um suporte adsorvente (Ex: carbono, resinas de troca iónica, celulosas, argilas) [1]. Esta imobilização

pode ser simples e dificilmente afetará a atividade da enzima, mas a liberação do biocatalisador é comum devido às ligações fracas estabelecidas. O rendimento da imobilização também poderá ser bastante baixo, pois a enzima está totalmente exposta, o que leva a uma maior sensibilidade ao ambiente reacional dos processos [1,4].

O aprisionamento é uma imobilização física alternativa, tipicamente usada através do uso de géis de aprisionamento ou micro encapsulamento do biocatalisador. O aprisionamento oferece proteção física contra o ambiente reacional, podendo ocorrer liberação ocasional de enzima. Especificamente, o aprisionamento em gel ocorre pela formação de uma rede polimérica na presença de uma solução enzimática. Materiais poliméricos como a poliacrilamida, gelatina e alginato são normalmente os mais utilizados [1,8], mas têm o potencial de afetar as propriedades físicas, químicas e cinéticas do biocatalisador imobilizado [5]. Logo, a matriz de aprisionamento deve ser escolhida cuidadosamente para otimizar a imobilização e a eficiência da reação, minimizando em simultâneo os efeitos negativos na enzima [1,5].

Existe ainda outro método que confina a enzima numa microcápsula semipermeável. O micro-encapsulamento líquido resume-se a uma solução polimérica orgânica misturada com uma solução enzimática aquosa na presença de um tensioativo. Uma membrana polimérica é formada na interface líquido-líquido, sendo a fase aquosa contendo a enzima, retida no seu interior. Por outro lado, o micro-encapsulamento sólido resulta do aprisionamento de uma enzima numa membrana sólida, fibra oca, ou uma nano estrutura como a sílica sol-gel [1].

2.4.2. Química

A imobilização química ocorre por formação de ligações covalentes entre determinados aminoácidos da enzima e a matriz de suporte. As ligações covalentes são suficientemente fortes para prevenir a liberação de enzima da matriz, mas podem afetar a atividade devido a alterações conformacionais significativas da estrutura enzimática [1,4]. No geral, cadeias laterais de vários aminoácidos (ex: grupo guanidinil da arginina e os grupos carboxílicos do glutamato e aspartato) estão quimicamente ativas na formação da reação de imobilização [1]. À enzima e ao suporte podem ser adicionados grupos e cadeias funcionais ativas, que fazem uma mediação na afinidade entre os dois durante o processo

de imobilização [1,9]. Quando necessário, também é possível adicionar grupos funcionais na enzima através de técnicas de engenharia enzimática [1].

A imobilização enzimática envolve a ligação da enzima a um suporte insolúvel no meio onde é utilizado. Estes suportes podem ser de materiais inorgânicos (ex: sílica gel e alumina), orgânicos naturais (ex: proteínas (albumina e colagénio) e carboidratos (alginato, quitosano, celulose)), ou orgânicos sintéticos (ex: poliestireno, poliacrilamida, polipropileno) [1,3,8]. Os polímeros “inteligentes” são novos suportes com particular importância, pois alteram as suas características de acordo com alterações das condições ambientais (pH, temperatura, força iónica) [1]. As propriedades do suporte, principalmente determinadas pelos grupos funcionais, podem afetar a eficiência de imobilização, o rendimento da reação biocatalítica e a estabilidade do biocatalisador. Outras propriedades dos suportes como o tamanho, permeabilidade, área superficial, estabilidade mecânica, afinidade para proteínas, toxicidade e biocompatibilidade também são importantes [1]. Na presença de grupos funcionais na enzima e no suporte, podem ocorrer ligações químicas entre enzimas ou entre enzima e suporte.

De todos os agentes de ligação, o glutaraldeído é o mais utilizado devido ao seu baixo custo, elevada eficiência e maior estabilidade [1]. O grupo carbonilo do glutaraldeído é parte envolvida na reação de imobilização, que ocorre rapidamente mesmo à temperatura ambiente [1]. Como as ligações são irreversíveis e relativamente fortes, todo o sistema biocatalítico é mais estável face a variações no meio. Contudo, na generalidade dos casos, a atividade de uma enzima imobilizada quimicamente é mais baixa devido à ocorrência de reações secundárias e/ou por limitações de difusão pelo sistema imobilizado [3,4]. Por isso, o suporte deve ser cuidadosamente escolhido, pois pode afetar de forma muito significativa a performance cinética do sistema.

A eficiência da imobilização pode ser afetada por muitos fatores, dos quais se pode destacar a concentração da enzima, pH, força iónica, temperatura e o agente de ligação utilizado [3]. Como se pode observar na figura 2, existem vários métodos de aplicação para as ligações químicas. Nos métodos baseados na ausência de um suporte concreto, o sistema de imobilização pode ser estabelecido por ligações diretas entre diferentes formas de enzimas. Enzimas solúveis são usadas para criar uma matriz de enzimas interligadas (CLEs), que podem sofrer perdas drásticas de atividade, possuindo ainda fraca resistência mecânica. Agregados enzimáticos interligados (CLEAs) insolúveis, resultantes da

interação de agentes de ligação com soluções enzimáticas também têm sido estudados, mas apresentam resultados semelhantes aos anteriores CLEs. Enzimas cristalinas são usadas para formar cristais enzimáticos (CLCEs), que conservam um elevado nível de atividade enzimática por aumento da estabilidade contra as dificuldades ambientais das operações. Por fim, enzimas secas por pulverização (*spray-dried enzymes*) podem também criar ligações gerando agregados de enzimas secas (CLSDEs). Este método não é comum, pois as enzimas ficam muito suscetíveis a uma possível desativação durante o processo de secagem por pulverização [1].

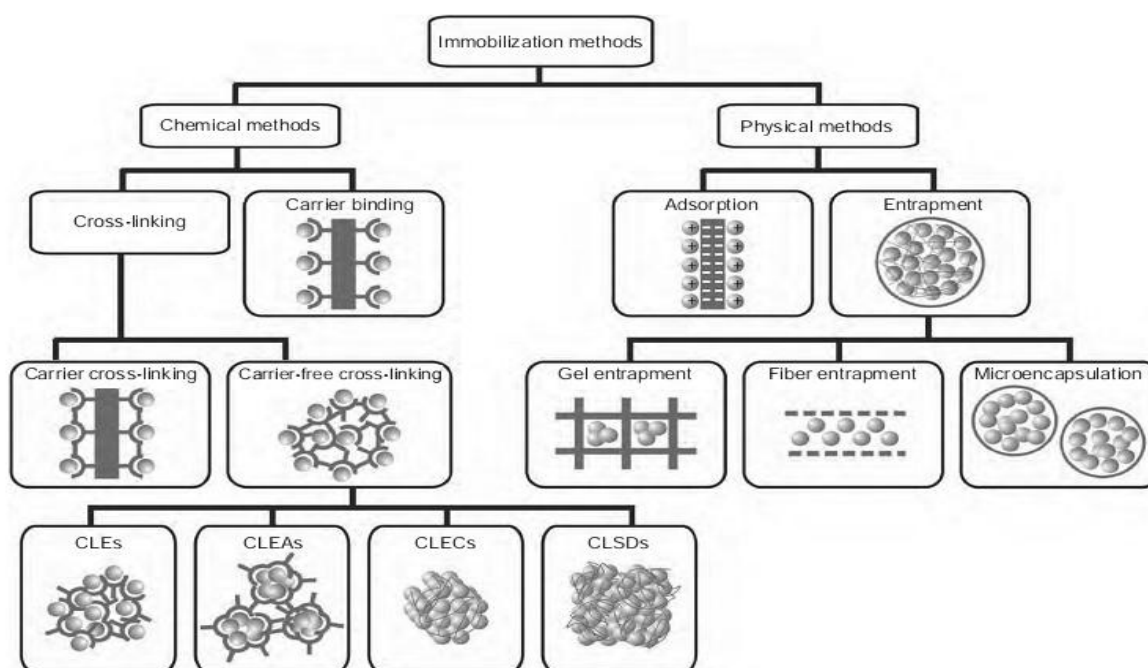


Figura 2-Esquema representativo dos diferentes tipos de imobilização [1].

2.5. Meio reacional

As reações promovidas por um biocatalisador têm de ter em conta a seleção do meio reacional, que pode ser um meio aquoso convencional ou meios não convencionais (solventes orgânicos, líquidos iônicos, solventes eutéticos [10]). No caso de bioconversões em sistemas multifásicos devem ser tomados em conta fenómenos interfaciais, a distribuição do substrato e do produto entre fases e a facilidade de separação das fases, para uma articulação eficaz das etapas de transformação e recuperação de produto [11].

O isolamento e purificação dependem das características do produto, pois vão influenciar a sua recuperação e a escolha das técnicas mais eficazes para o fazer, de acordo com a qualidade e pureza pretendidas [11].

As biotransformações estão associadas ao uso de biocatalisadores, onde a água é o solvente preponderante. É fácil compreender a utilização deste solvente em imensos estudos de cinética enzimática, pois é o mais comum na natureza [11]. No entanto, já algum tempo se chegou à conclusão que o uso exclusivo de água como solvente em meios de biotransformação limitava a produtividade de processos diversos, como por exemplo envolvendo substratos hidrofóbicos [11]. Por outro lado, também se descobriu que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes concentrados em lípidos, tornando estes meios, predominantemente não aquosos, igualmente adequados à atividade biocatalítica [11]. A junção destes dois aspetos levou à utilização de solventes orgânicos, líquidos iónicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou sólidas aos quais se convencionou chamar de meios não convencionais [11]. A utilização de meios não convencionais proporciona algumas vantagens como [11]:

- Solubilização de substratos e/ou produtos hidrofóbicos, levando ao desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada.
- Redução de efeitos inibitórios e/ou tóxicos por parte do substrato e/ou produto, em que o solvente orgânico pode ser selecionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos.
- Deslocamento de equilíbrio químico, nomeadamente no caso das enzimas hidrolíticas como as lipases, em que o equilíbrio pode ser deslocado no sentido inverso (de síntese), através do controlo da atividade da água.

No que diz respeito aos solventes orgânicos, também existem desvantagens. A Tabela 1 mostra as vantagens e desvantagens destes solventes.

Tabela 1-Vantagens e desvantagens da utilização de solventes orgânicos [11].

<u>Características do processo</u>	<u>Vantagens e desvantagens</u>
Operação do reator	(+) Solubilização de substratos/produtos hidrofóbicos (+) Redução da inibição/toxicidade de substratos/produtos (+) Deslocamento do equilíbrio químico (-) Limitações à transferência de massa (-) Toxicidade para o biocatalisador
Isolamento e purificação	(+) Recuperação de substratos/produtos (+) Concentrações elevadas de produtos (-) Formação de emulsões

A seleção dos solventes orgânicos a utilizar deve ter em conta os critérios expostos na tabela 2.

Tabela 2-Critérios para a escolha de um solvente orgânico [11].

Físico Químicos
<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade para solubilização do substrato e do produto • Coeficiente de partição • Densidade • Pontos de fusão e de ebulição • Tensão superficial • Viscosidade
Biológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidade para o biocatalisador
Segurança
<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidade • Inflamabilidade
Logísticos
<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de obtenção • Eliminação de resíduos
Económicos
<ul style="list-style-type: none"> • Custo

Os sistemas biocatalíticos que recorrem à aplicação de solventes orgânicos podem ser agrupados de acordo com a natureza da mistura [11]:

- Mistura homogénea do meio aquoso e solventes orgânicos miscíveis em água.
- Mistura de duas fases líquidas orgânico-aquosas.
- Biocatalisadores dissolvidos em solventes orgânicos: micelas invertidas e enzimas modificadas covalentemente.

- Biocatalisadores ressuspensos em solventes orgânicos com baixos teores de água: enzimas em pó (obtidas por liofilização ou cristalização), na ausência de fase aquosa.

Nos meios não aquosos existe um fator especialmente importante a ter em conta, nomeadamente o efeito da água na atividade e estabilidade da enzima. Em baixos teores de água, a atividade enzimática é geralmente reduzida. Tipicamente, a atividade das enzimas aumenta com o aumento da camada de hidratação devido à ação lubrificante da água, promovendo a flexibilidade interna da enzima. A curva típica da variação da atividade específica da enzima em função da atividade da água apresenta um máximo, não sendo a atividade da enzima infinitamente crescente [11]. Por outro lado, a estabilidade enzimática, normalmente, diminui com o aumento da quantidade de atividade da água. A água atua numa variedade de mecanismos causando desnaturação das proteínas, conduzindo à inativação das enzimas [11].

No sistema de micelas invertidas é possível garantir uma estabilidade elevada através do controlo da atividade da água. Em biocatalisadores ressuspensos em solventes orgânicos, obtêm-se em geral estabilidades elevadas, pois a quantidade de água é muito pequena (atividade da água <1) e as enzimas adquirem uma rigidez conformacional superior (desidratadas). Para além disso, não ocorre proteólise, causa comum da desnaturação em água [11]. É de salientar, que a água funciona como substrato nas reações de hidrólise e deste modo estas reações são favorecidas com o aumento da quantidade de água, o inverso ocorre nas reações de síntese, como é o caso das esterificações.

Tabela 3-Exemplos de processos estabelecidos a nível industrial [11].

Reação	Biocatalisador	Solvente	Companhia
Epoxidação 1-octeno	<i>Nocardia corallina</i>	n-hexadecano	Nippon Mining
Hidrólise de ésteres	<i>Subtilisina</i> (imobilizada) lipase	Vários	Bayer Sumitomo, Chemie Linz AG; BASF; Schering Plough
Desidrogenação de esteróides	<i>Arthrobacter simplex</i>	Tolueno	Upjohn
Dessulfurização	<i>Rhodococcus sp.</i>	Óleo (substrato)	Energy Biosystems

2.6. Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são um grupo de enzimas de grande importância em biotecnologia, estando amplamente distribuídas pela natureza em bactérias, fungos, plantas e animais [8,12]. São uma classe de hidrolases muito usadas em química orgânica sintética, catalisando a hidrólise quimio-, regio- e ou estéreo seletiva de ésteres, ou a reação inversa em solventes orgânicos [13,14]. Em meios não aquosos, as lipases podem catalisar reações como esterificação, interesterificação e transesterificação [13,14]. A utilização mais conhecida realizada pelas lipases é a hidrólise de triglicéridos, dando origem a glicerol e ácidos gordos livres, associada à síntese de biodiesel [10].

O centro ativo das lipases é geralmente composto pela existência de um trio de aminoácidos, serina, histidina e aspartato [14] e está protegido por um oligopéptido em hélice que funciona como um escudo [13]. Este escudo, após interação com uma interface hidrofóbica, como por exemplo um lípido, sofre movimento permitindo que o centro ativo fique exposto para o acesso livre do substrato [13]. Este fenómeno chama-se ativação interfacial [13], e de facto a reação das lipases ocorre na interface entre a fase aquosa e a orgânica, devido à polaridade oposta entre a enzima (hidrofílica) e os substratos (hidrofóbicos) [1]. Estudos recentes revelaram que a atividade das lipases está muito mais suscetível a problemas de acessibilidade ao centro ativo por parte dos substratos, do que a fenómenos de desnaturação e inativação [1].

As lipases são utilizadas comercialmente em numerosas aplicações: composição de detergentes, em limpezas, produção de queijo, processamento do couro e papel. Na indústria da gordura e dos óleos, muitos processos convencionais têm sido substituídos por outros com base no processamento enzimático [1]. Um dos processos comerciais mais recentes é a conversão de óleo de palma numa gordura substituta da manteiga de cacau, conseguida pela interesterificação em solvente orgânico [1]. O uso de lipases na preparação de álcoois puros, aminas e ácidos carboxílicos constitui um método prático relativamente comum na síntese em química orgânica e farmacêutica [1].

2.6.1. Lipase B da *Candida antarctica*.

A levedura *Candida antarctica* produz duas lipases diferentes, a lipase A (CALA) e a CALB [15,16].

A CALB é uma enzima estável num intervalo relativamente amplo de pH [17], sendo mais estável em ambientes alcalinos [15]. Apresenta uma estabilidade térmica assinalável, é descrito que se mantém ativa a temperaturas superiores 100°C [18-20], só perdendo atividade a partir dos 120°C [19,21]. As lipases da *Candida antarctica* são das enzimas mais estáveis termicamente descritas até hoje [15]. A CALB não é tão estável em solução como a CALA, mas imobilizada torna-se muito estável podendo ser usada em operação por milhares de horas sem perda significativa de atividade [15].

A CALB é uma enzima muito bem caracterizada, tem uma grande variedade de aplicações e não existe a ativação interfacial típica das lipases [15]. Na forma imobilizada, este biocatalisador tem sido encontrado em publicações a tolerar grande variedade de condições experimentais, e a ser particularmente eficiente a catalisar um grande número de diferentes reações, incluindo algumas que têm passado para escala comercial [15].

Esta enzima exibe um altíssimo grau de seletividade para os substratos, tanto ao nível regio-seletivo como enantio-seletivo. Tem sido muito utilizada como um catalisador regio-seletivo. A área mais utilizada é na resolução de álcoois racémicos, aminas e ácidos, ou na preparação de compostos opticamente ativos. A obtenção de compostos opticamente puros é muito difícil por outras vias, sendo estes de grande valor [15]. Alguns produtos obtidos com sucesso pela CALB como catalisador, estão ilustrados na Figura 3.

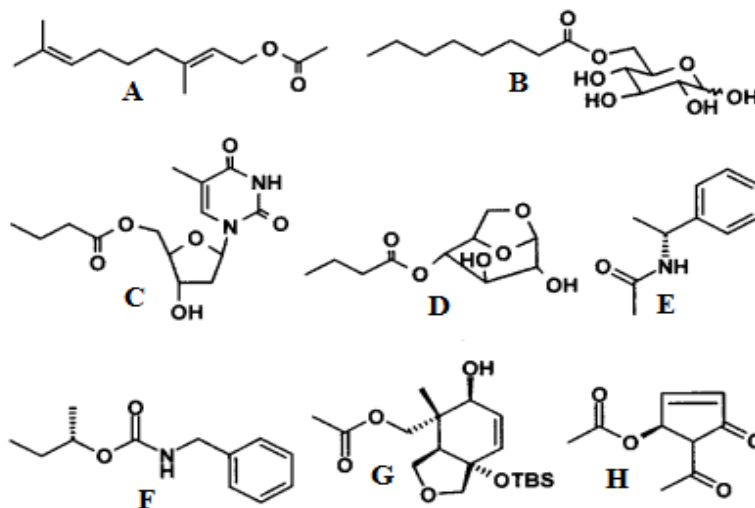


Figura 3-Exemplos moléculas sintetizadas com sucesso usando CALB como catalisador.
Ésteres: A, B, C, D, G, H. Amida: E. Carbamato: F [15,17].

A CALB tem uma ampla especificidade para substratos e pode ser usada, potencialmente, para a síntese de muitas reações, levando à formação de estruturas menos complexas. A CALB é a enzima imobilizada disponível com um dos preços mais elevados (*Novozym*[®] 435 (*Novozymes A/S*) e *Chirazyme L-2* (*Roche Molecular Bio-chemicals*)) e esse é um dos fatores mais limitantes à sua presença industrial [15]. Os produtos sintetizados, atualmente, são moléculas especiais de alto valor acrescentado, sendo mais importante a pureza do biocatalisador que o preço a que é comprado. Se uma preparação mais barata de lipase imobilizada estivesse disponível no mercado, provavelmente iria abrir portas a aplicações de produtos de menor valor como os poliésteres, biodiesel e outros ésteres simples produzidos em grande quantidade, produtos que de outra forma nunca terão retorno económico com as imobilizações atuais [15].

2.7. Imobilização de lipases em celulose

A celulose é dos suportes menos utilizado e estudado para imobilização enzimática [3,8]. No entanto de entre os materiais de suporte conhecidos, a celulose destaca-se pela sua biocompatibilidade e por ser inerte em condições fisiológicas (9). Além disso, possui um caráter duplo (hidrofílico/hidrofóbico) que pode ser ajustado de acordo com as necessidades [9]. Por fim mas não menos importante, a celulose é um polímero natural, abundante e biodegradável [9,22]. Estas características fazem da celulose um suporte potencialmente apetecível [23].

A celulose bacteriana possui uma estrutura molecular semelhante à celulose das plantas, mas apresenta propriedades únicas face a esta [24,25], como maior pureza, maior cristalinidade, maior grau de polimerização, maior capacidade de absorção e retenção de água, maior elasticidade e forte biocompatibilidade [22,24,26]. O diâmetro das suas fibras varia entre 20-100nm [22]. Desta característica resulta uma elevada área superficial por unidade de massa [22]. Estas propriedades tornam a celulose bacteriana atrativa para uma vasta gama de aplicações em diversos campos, especialmente nas áreas da biomedicina e biotecnologia [24], mas também na indústria papelreira, alimentar e têxtil [25], sendo expectável que se torne um polímero muito utilizado.

A celulose bacteriana é tipicamente produzida pelo *Glucanacetobacter xulinus* (também chamado *Acetobacter xylinum*) formando uma espécie de película branca

gelatinosa na interface ar-líquido, que quando desidratada assemelha-se a uma folha de papel translúcido [22,24].

Algumas publicações recentes têm utilizado lipases imobilizadas em celulose. Karra-Châabounia et al. (2008) descreveram a imobilização de lipase do *Rhizopus oryzae* por adsorção em fibras de celulose oxidadas, para aplicação na esterificação de ácido oleico com butanol, sendo a conversão máxima obtida cerca de 80% [27].

Huang et al. (2011) realizaram a imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente numa membrana de nanofibras de celulose oxidada. A oxidação permitiu a gênese de grupos aldeído, aos quais os grupos amínicos primários das lipases se puderam ligar covalentemente. Apesar dos autores terem concluído que a estabilidade aumentou significativamente, ainda assim, quando reutilizaram o suporte pela 2ª vez existiu uma perda de atividade de 20% e de 50% na 3ª vez, em relação à 1ª utilização. Na oitava utilização a atividade foi 30% do valor inicial [2].

Chen et al. (2011) também aplicaram o mesmo tipo de membrana de nanofibras de celulose oxidada com a mesma lipase imobilizada covalentemente, mas desta vez não ligada diretamente aos grupos aldeídos formados, mas sim a um intermediário espaçador de ligação (pentaetilenohexamina), funcionando como uma espécie de corda entre a celulose e a enzima [9]. A introdução de um espaçador aumenta a distância entre o suporte e a enzima imobilizada, fornece um ambiente moderadamente hidrofóbico à lipase e oferece grande liberdade de movimento à enzima, minimizando os efeitos estéricos desfavoráveis dos suportes sólidos [9]. Os autores concluíram que a atividade de retenção aumentou 76% com a introdução do espaçador, face à ausência dele. Este suporte foi aplicado num reator bifásico para a reação típica da hidrólise de lípidos, obtendo ácidos gordos e glicerol. A atividade máxima registada foi $9,83 \times 10^4$ U/m², sendo que uma unidade (U) corresponde a 1 μmol de ácidos gordos libertados por hora nas condições do ensaio [9].

2.8. Esterificações catalisadas por lipases

A partir no início do milénio as reações catalisadas por enzimas em meios não convencionais têm vindo a ser cada vez mais experimentadas. A síntese de ésteres promovida por lipases é um bom exemplo disso.

No passado foram descritas algumas tentativas de síntese de esteres fenólicos com lipases livres em meios não convencionais, mas os rendimentos eram baixos devido à inibição da enzima pelos solventes orgânicos [1]. Contudo, poderá ser constatado à frente que a imobilização resolveu este problema.

2.8.1. Ésteres Eugenólicos (Eugenil benzoato, caprilato e acetato)

O eugenol é o maior componente do óleo de cravo-da-índia (recurso renovável) e é aplicado como agente aromatizante em cosméticos, produtos alimentares e com particular destaque na medicina dentária como antisséptico, devido ao seu efeito detergente [28,29]. Muitos estudos têm revelado que o eugenol possui atividade antioxidante e anti-inflamatória, pois inibe a síntese de prostaglandinas, promove a quimiotaxia dos neutrófilos, e tem ação antipirética [16,28,29]. Além disso, tem mostrado propriedades antimicrobianas, antidepressivas, sendo também antígeno tóxico e anticarcinogénico [28,30]. Contudo, elevadas concentrações de eugenol têm efeitos adversos, despoitando reações inflamatórias e alérgicas, possivelmente devido à formação de radicais fenoxil, resultantes dos intermediários de quinona por via da sua atividade pro-oxidativa [28].

No intuito de diminuir os efeitos adversos do eugenol, vários compostos derivados dele têm sido sintetizados e investigadas as atividades antioxidantes, citotóxicas e antimicrobianas [28,29]. O dímero de eugenol, por exemplo, é uma molécula menos citotóxica e tem um poder antioxidante muito elevado face ao eugenol, o que sugere que poderá ser um potente inibidor de fenómenos de inflamação [28]. Por outro lado, quando o grupo hidroxilo do eugenol é protegido por um grupo volumoso e moderadamente lipofílico (como o benzoato), o éster obtido pode atuar com inibidor da lipoxigenase. Isto acontece, porque a parte aromática e alifática dos derivados de eugenol liga-se à porção hidrofóbica do centro ativo da lipoxigenase [28]. É de realçar que o poder inibitório é superior quando o eugenol é esterificado com ácido benzoico ou similares [28]. O ácido benzoico também é conhecido pela sua capacidade de combater fungos e leveduras, sendo menos ativo no combate a bactérias [28].

Recentemente, vários ésteres eugenólicos têm sido sintetizados quimicamente [30-32] e avaliadas principalmente as suas potencialidades como inibidores da lipoxigenase, responsável pela rancificação dos alimentos [16,31]. Estas esterificações químicas do eugenol são realizadas com haletos de ácidos (cloro) em soluções aquosas próprias a 130°C

[30]. Devido ao potencial destas moléculas, têm sido dados os primeiros passos relevantes na síntese enzimática, pois oferece vantagens: reações em condições médias, necessidade de pouca energia, elevados rendimentos e pureza em pouco tempo de reação [30]. Desta forma, será possível aproveitar com maior facilidade os benefícios que os ésteres eugenólicos têm para oferecer. Moléculas como o eugenol palmitato, miristato e benzoato tem sido introduzidos como potenciais drogas do futuro na luta contra muitas doenças [30].

Horchani et al. (2009) realizaram a primeira tentativa de síntese enzimática de eugenil benzoato [28]. Usaram um conjunto de lipases não comerciais extraídas do *Staphylococcus aureus* e imobilizadas em carbonato de cálcio. Neste projeto foram experimentadas quatro variáveis: temperatura (33-41°C), quantidade de enzima (160-240 UI), rácio molar ácido benzoico/eugenol (0,78-1,22) e volume de solvente (4,6-5,4 mL clorofórmio). As unidades de atividade enzimática foram expressas em unidades por mL de solução enzimática. Uma unidade (UI) de lipase foi definida como a quantidade necessária de enzima para catalisar a libertação de uma μmol de ácido gordo por minuto em condições ótimas, sendo azeite o substrato.

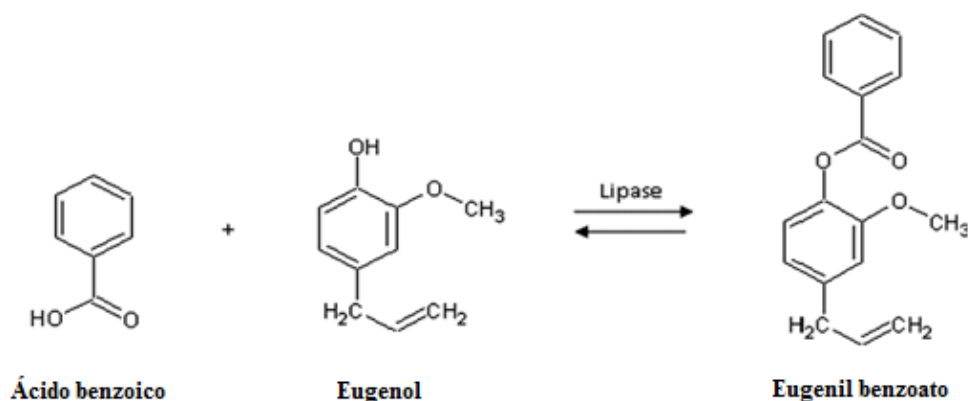


Figura 4-Síntese do Eugenil benzoato [28].

Os reatores consistiram em pequenos frascos com tampa de rosca, agitados a 200rpm durante 6 horas, onde ocorrem as esterificações nas várias condições.

Da otimização do processo com recurso a métodos estatísticos, com obtenção de gráficos de superfície e confirmação experimental, resultou que as condições onde se obteve melhor rendimento de conversão (75%) foram: temperatura 41°C, 240 IU de lipase imobilizada, rácio molar ácido benzoico/eugenol 1,22, num volume de 4,6mL de clorofórmio [28].

Mais recentemente, Chaibakhsh et al. (2012) publicaram um artigo sobre a síntese enzimática de outro éster eugenólico, neste caso o eugenil caprilato [30]. A biocatálise foi promovida usando a lipase imobilizada mais barata do mercado (*Lipozyme TLIM*, lipase comercial do *Thermomyces lanuginose* imobilizada em sílica gel com atividade de 170 UI/g) [30], e *Triton*[®] X100 como adsorvente de água.

Neste trabalho foram testadas algumas variáveis: temperatura, tempo de reação, ausência ou presença de solvente (hexano), agitação ausente e presente (250rpm), quantidade de enzima (mg) e rácio molar eugenol/ácido caprílico.

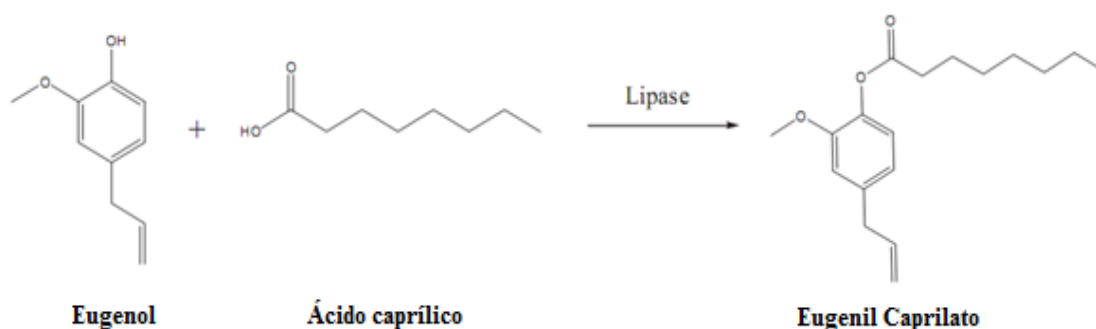


Figura 5-Síntese de Eugenil caprilato [30].

As reações ocorreram num sistema de refluxo com agitação magnética nas várias condições testadas. Também nesta publicação foram utilizados métodos estatísticos para otimização das condições, que foram confirmadas experimentalmente. Desta forma, as condições ótimas obtidas, que corresponderam a uma taxa de conversão de 72.2% foram as seguintes: 65°C, 250rpm, 259 minutos, 100mg de enzima e rácio molar eugenol/ácido caprílico 2:1 em ausência de solvente [30].

A síntese mais recente de um éster eugenólico por via enzimática foi realizada por Chiaradia et al. (2012) [29]. Os autores sintetizaram eugenol acetato por esterificação do eugenol com anidrido acético, usando como catalisador a imobilização comercial de CALB *Novozym*[®] 435 num meio sem solvente. As reações foram realizadas em *erlenmeyers* de 50mL com agitação orbital (150rpm). Foram estudadas as variáveis: rácio molar dos reagentes, temperatura, quantidade de enzima e tempo de reação. A melhor taxa de conversão obtida foi 99% nas seguintes condições: rácio molar anidrido acético/eugenol (3:1), temperatura 50°C e 5,5% da massa total dos substratos de enzima. Os autores ainda referiram que com apenas 1% da massa dos substratos de enzima e uma temperatura de

60°C, se conseguiram resultados muito próximos da conversão máxima [29]. Realizaram ainda um estudo antimicrobiano com vários microrganismos, que revelou um maior poder antimicrobiano do eugenil acetato em comparação com o eugenol [29].

2.8.2. Propil Galato

O propil galato é usado como antioxidante em alimentos processados, nos materiais das embalagens alimentares e em cosméticos para evitar rancificação e degradação [33,34]. De acordo com a lista da Administração Federal para Drogas e Alimentos (FDA), o propil galato é também aplicado como estabilizante na preservação de preparações médicas [33]. Na União Europeia e em vários países também é um aditivo autorizado. Devido à sua utilização cada vez maior, o seu potencial tóxico tem vindo a ser estudado *in vivo* e *in vitro* testando propriedades como a capacidade mutagénica e efeitos citogenéticos [33]. Embora apresente baixa toxicidade, provoca vários efeitos adversos nas funções de células e tecidos [34]. Diversos estudos têm demonstrado benefícios do propil galato como antioxidante [34], agente químico preventivo e anti inflamatório. Por exemplo, é eficiente a proteger as células do fígado da peroxidação promovida por radicais livres de oxigénio [33]. Além do mais, em relação ao poder antioxidante é quase tão eficaz como o *Trolox* (análogo da vitamina E), é mais eficaz que o ácido ascórbico (vitamina C) e tem poder antioxidante e antibacteriano superior ao ácido gálico [33]. Tradicionalmente, os antioxidantes são extraídos de recursos naturais ou produzidos por síntese química. Uma vez que os processos químicos têm vindo a ser progressivamente restritos em algumas aplicações, num futuro próximo métodos dependentes de técnicas experimentais complexas e solventes orgânicos serão proibidos, principalmente na indústria alimentar [33]. A utilização de lipases tem grande potencial para evitar estes problemas, pois produz com elevada pureza com poucos ou nenhuns processos posteriores.

Alguns galatos têm vindo a ser estudados devido às suas propriedades antifúngicas e antioxidantes, com objetivo de serem mais utilizados comercialmente [35]. Os galatos resultam da esterificação do ácido gálico com um álcool.

Bouaziz et al. (2010), descreveram a síntese de propil galato por via enzimática [33].

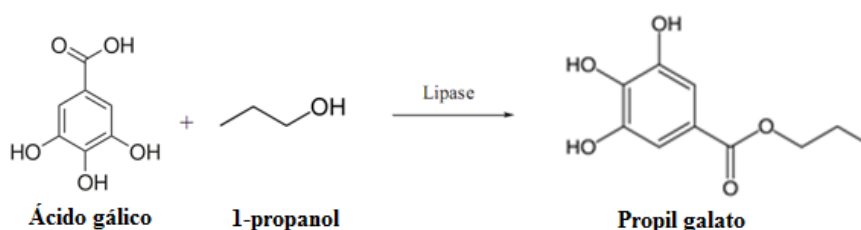


Figura 6-Síntese do propil galato.

O propil galato foi sintetizado por esterificação direta e sem solvente do 1-propanol com ácido gálico, com uma lipase não comercial imobilizada em carbonato de cálcio (lipase do *Staphylococcus xylosus*) [33]. Vários parâmetros da reação foram testados: quantidade de enzima (100-500IU), rácio molar 1-propanol/ácido gálico (100-160) e a temperatura (45-55°C), sendo o processo otimizado por auxílio de métodos estatísticos. A unidade enzimática foi a mesma utilizada na síntese do eugenil benzoato. As reações foram conduzidas em frascos com tampa de rosca, com agitação (200rpm) durante 8 horas. O rendimento máximo de conversão obtido foi 90% para as seguintes condições: 400IU de lipase imobilizada, rácio molar 1-propanol/ácido gálico (160) e temperatura de 52°C [33].

Horchani et al. (2011) referiram que já foi atingida uma taxa de conversão de 95% com lipase da *Candida antarctica* [16].

Para demonstrar o impacto da imobilização enzimática na eficiência da reação, foram comparadas as taxas de conversão nas condições ótimas com lipase livre e com lipase imobilizada. O resultado pode ser visto na Figura 7, e demonstrou que existe um aumento muito significativo do rendimento da reação com enzima imobilizada.

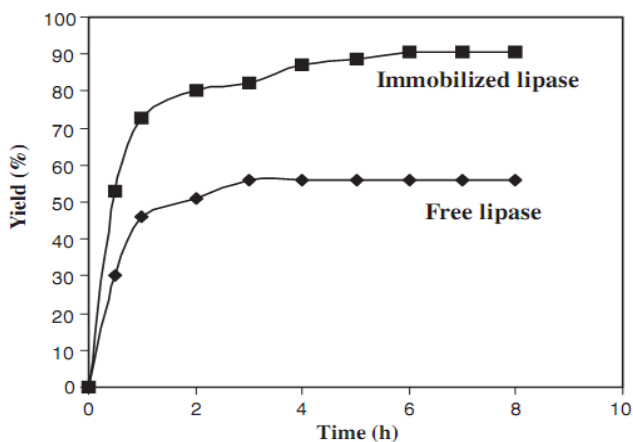


Figura 7-Rendimento da síntese de propil galato em função do tempo, para enzima imobilizada e livre nas condições ideais [33].

2.8.3. Isopropil acetato

Verna et al. (2011) sintetizaram o éster isopropil acetato a partir de ácido acético e isopropanol num reator em batelada, com lipase do *Bacillus cereus* imobilizada em sílica [36]. Este éster é uma fragrância aromatizante e é usado como tal pela industrial, pois possui um odor a fruta. Além disso, é também um solvente aplicado em variados processos de produção industrial [36].

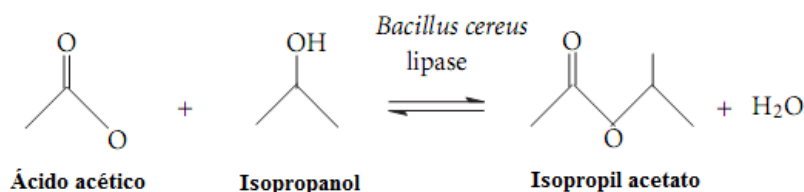


Figura 8-Síntese do Isopropil acetato [36].

A conversão máxima obtida foi 97% (73mM isopropil acetato), durante 9h a 55°C em heptano com agitação (160rpm), usando 25mg de lipase e para uma composição de 100mM de isopropanol/ 75mM de ácido acético. Para controlar atividade da água foi adicionado cloreto de lítio (LiCl), que permitiu aumentar consideravelmente a taxa de conversão face a outros sais e ao controlo (sem sais). Este facto permitiu aos autores concluir que quando a enzima está com hidratação abundante perde rigidez, e consequentemente a taxa de conversão é menor [36]. Como já foi dito anteriormente, a presença de água estimula a hidrólise [11], exatamente o oposto do que se pretende nas esterificações, e neste caso também pode justificar o abaixamento da taxa de conversão em ausência de agente secante, pois atinge-se o equilíbrio reacional não permitindo que a reação avance.

Neste trabalho também foram testadas maiores quantidades de enzima, e quanto maior a quantidade de enzima, menor foi a taxa de conversão observada (todas as condições ideais em ausência de LiCl). Isto pode dever-se ao facto de maior quantidade de enzima levar, consequentemente, mais água para o reator, prejudicando a esterificação [18].

Tabela 4-Efeito da quantidade de enzima utilizada na síntese de isopropil acetato em ausência de agente secante e com as restantes condições ideais [36].

Enzima imobilizada (mg)	Síntese de éster (mM)
25	67± 0,01
50	66± 0,01
75	65± 0,02
100	63± 0,01
125	62± 0,02

A capacidade de reutilização do suporte de imobilização também foi testada. Ao final de 8 ciclos nas condições já vistas, o sistema biocatalítico perdeu mais de 50% do seu poder inicial, sendo a taxa de conversão ao 8º ciclo de reutilização 40% [36].

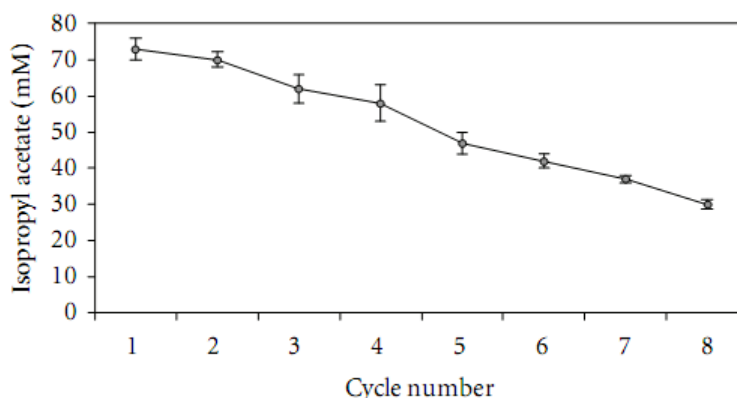


Figura 9-Estudo da capacidade de reutilização do sistema biocatalítico nas condições ideais [36].

2.8.4. 2-etilhexil palmitato

Tan et al. (2005) desenvolveram uma nova membrana de imobilização enzimática (algodão modificado) fixa no interior de um reator em batelada. A síntese testada foi a do 2-etilhexil palmitato ou isooctil palmitato, fruto da esterificação do isooctanol com ácido palmítico [30]. Esta molécula tem muitas aplicações na cosmética, farmácia, alimentação e indústria química, sendo também aplicada na produção de polímeros e lubrificantes [37].

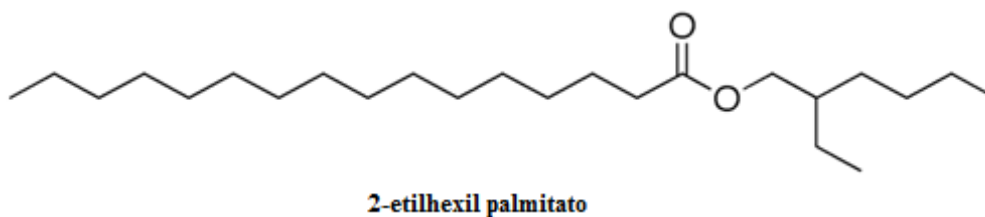


Figura 10-Representação molecular do 2-etilhexil palmitato.

A lipase da *Candida sp.* 99-125 foi o catalisador imobilizado na membrana de algodão modificada por surfactantes (*Tween 80* e *PEG6000*) ($130\text{IU}/\text{cm}^2$). A taxa de conversão máxima (95%) foi obtida para um rácio molar de ácido palmítico/ isooctanol 1:1,3 até 1:1,5 (mol/mol), temperatura de reação 40°C e 5000 IU/g até 6000 IU/g de enzima usada na imobilização. A atividade enzimática foi determinada pelo método da emulsão de azeite, e 1 unidade de atividade (IU) correspondeu à quantidade de enzima necessária para produzir $1\mu\text{mol}$ de ácido gordo por minuto [37].

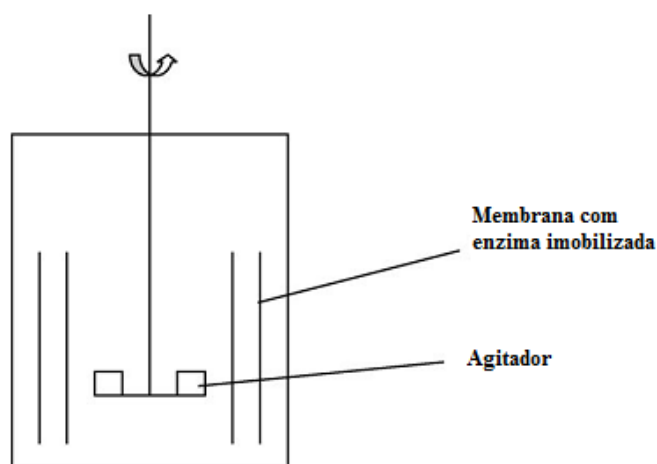


Figura 11-Reator de membranas com agitador de 6 pás planas, usado por Tan et al. (2005) [37].

Os surfactantes foram adicionados à membrana de algodão com intuito de melhorar a dispersão das enzimas pela membrana, e fazer com que os substratos estejam disponíveis com maior facilidade para a biocatálise, aumentando assim a taxa de esterificação. Os surfactantes, neste contexto, também podem ser chamados de agentes de co-imobilização [37]. Existem estudos mostrando que a velocidade de reação aumenta cerca de 1,5 vezes na presença de agentes co-imobilizadores [37]. Outro parâmetro testado foi a velocidade de agitação. Revelou que quanto maior a velocidade de agitação, maior é a velocidade de reação. Isto pode ser importante se for pretendida uma reação mais rápida, caso contrário, após 10 horas de reação as taxas de conversão finais foram muito próximas independentemente da velocidade de agitação testada, não se justificando o gasto energético numa agitação mais vigorosa [37]. Os autores experimentaram quatro quantidades de enzima imobilizada (1000, 2000, 3000, 5000 IU). A taxa de conversão foi ligeiramente superior quando aumentaram a quantidade de enzima. A utilização de maior

quantidade de enzima facultou mais estabilidade ao sistema biocatalítico, permitindo reutilizar mais vezes sem perder atividade enzimática (Tabela 5).

Tabela 5-Relação entre a quantidade de enzima utilizada, número de reutilizações do suporte catalítico e respectivas atividades [37].

Lipase adicionada (IU)	1000	2000	3000	5000
Conversão nas reutilizações (%)				
1	93,5	94,9	94,9	97,5
2	96,6	96,4	96,7	97,3
3	49,7	93,0	96,7	97,5
4		43,5	95,3	97,0
5			63,0	96,7
6			55,1	97,3
7				97,3
8				97,4
9				94,7
10				92,1

Como se pode ver na Figura 12, este suporte de algodão modificado com surfactantes resistiu a cerca de 21 ciclos de 11 horas, mantendo taxas de conversão elevadas.

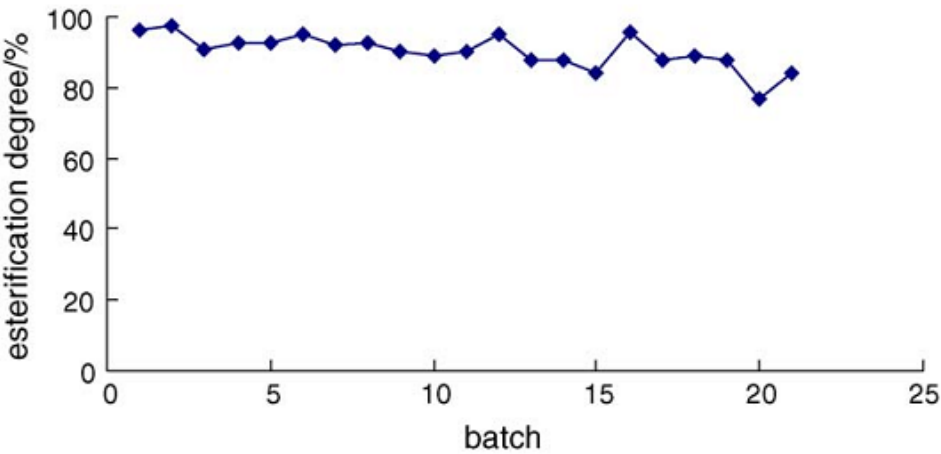


Figura 12-Estabilidade da enzima imobilizada ao longo das reutilizações nas condições ideais [37].

Os autores concluíram que com este tipo de membrana e reator, existe grande potencial de poder passar para a produção em larga escala [37].

2.8.5. Esterificações em reatores de fluxo contínuo

Em seguida serão expostas mais reações de esterificação catalisadas por lipases imobilizadas, mas com reatores em sistema de fluxo contínuo. Este tipo de reator não é tão comum neste tipo de aplicação, mas existem alguns casos a destacar.

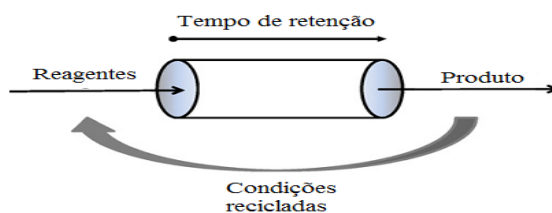


Figura 13-Ilustração do sistema de fluxo contínuo [6].

Nos anos 90 do século passado, Carta et al. (1992) imobilizaram lipase da *Candida cylindracea* em *nylon* com o objetivo de sintetizar ésteres de cadeia curta (etil propionato, isoamilpropionato e isoamilbutirato). O reator de fluxo contínuo consistiu numa coluna de cromatografia de vidro (2,5cm diâmetro interno, 40cm comprimento), empacotada com enzima imobilizada (847mg de enzima, 76g total suporte *nylon*). Conseguiram um processo de alta produtividade (0,25mol/L) para o isoamilpropionato, num fluxo de 1cm³/min, a 25°C em hexano [6].

A esterificação entre ácido láurico e 1-hexanol, foi experimentada por Chang et al. (2007) usando o catalisador *Lipozyme IM-77* (1,5g) e hexano como solvente. Foram conseguidas taxas elevadas de conversão (97%) num fluxo de 4,5mL/min a 45°C. Também aqui foi usado um reator de leito empacotado semelhante ao anterior [6].

A produção de ceras também tem vindo a ser explorada por Wehtje et al. (1999). Usando lipase SP 435 da *Candida antarctica* (200mg) empacotada num tubo de silicone ou PVC (3mm diâmetro) foi testada a esterificação entre ácido palmítico e 1-hexadecanol, a 65°C. Durante uma semana de operações, foi possível produzir 50g de hexadecanil palmitato com 0,4g de biocatalisador [6].

Os biotensioativos são agentes de elevado poder emulsionante. O uso de reatores empacotados para síntese de ésteres de manose e frutose aplicados a este propósito já foram descritos por diferentes investigadores [6]. Em ambos os casos, a síntese em fluxo contínuo permitiu reduzir os longos tempos de reação típicos das reações em batelada. A esterificação entre manose e ácido láurico ou mirístico, obteve resultados de produtividade

na ordem dos 350g/L por dia. As reações foram realizadas numa coluna de vidro (15cm comprimento e 1,15cm de diâmetro) empacotada com 3,5g de partículas *Chirazyme L-2* [6].

Várias tentativas de síntese de ésteres de frutose com ácido oleico foram realizadas com lipase *Lipozyme IM* em leito empacotado. Os melhores resultados obtidos apresentaram taxas de conversão no produto desejado entre 80-85% [6].

Chen et al. (2011) apresentaram um reator de leito empacotado combinado com irradiação por ultrassons para a esterificação entre ácido cafeico e 2-fenil etanol, catalisada por *Novozym*[®] 435 [6].

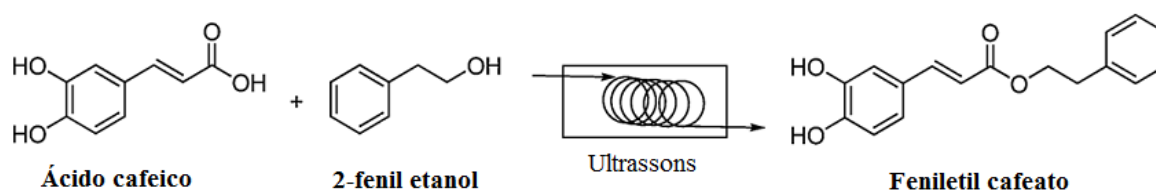


Figura 14-Síntese de feniletil cafeato em fluxo contínuo com banho de ultrassons [6].

A coluna utilizada de aço inoxidável (25cm comprimento e 0,46cm de diâmetro) foi colocada num banho de ultrassons. A adição dos ultrassons ao sistema, nas condições de fluxo de contínuo, permitiu um aumento de rendimento quando comparado com o mesmo sistema sem ultrassons. Nas condições ótimas obtidas, o rendimento de produção de éster foi de 97,8% e o reator operou por 6 dias sem queda de rendimento [6].

2.9. Conclusão

Os biomicroreatores, com as suas vantagens específicas sobre os sistemas clássicos, têm vindo a demonstrar sucesso em processos fermentativos em condições controladas de pH, temperatura e substratos dissolvidos, mas novos desenvolvimentos são necessários e esperados para que possam ser usados largamente na indústria, como uma ferramenta viável de pesquisa e produção.

Futuras pesquisas focar-se-ão no desenvolvimento de biorreatores feitos de polímeros baratos, descartáveis e sensores em tempo real muito importantes para o controlo dos processos. A habilidade de passar para uma escala piloto ou industrial mantendo a eficácia do processo, tornará os microreatores uma parte importante da produção industrial, nem que seja por uso eficiente de vários microreatores em paralelo.

Alguns objetivos dependem de avanços da engenharia, tais como: estratégias de controlo da alimentação de substrato para sistemas em *fed-batch*, que é o mais comum da realidade industrial, terão de ser investigadas em micro escala. Além disso, conseguir sistemas de controlo sensivelmente eficientes em volumes tão pequenos e em tempo real, será uma das prioridades das pesquisas no futuro. Da mesma forma, a integração e desenvolvimento de técnicas de separação e isolamento de produtos serão importantes para a eficiência dos processos analíticos e rendimento dos processos.

Também ainda há muito a fazer para que se obtenham suportes de imobilização robustos, economicamente viáveis e reutilizáveis por muito tempo sem ocorrer a perda de atividade catalítica. As aproximações estatísticas, pelo método de superfície para estimar as condições ótimas de uma reação, são uma ferramenta importante e fiável, embora não dispensem a respetiva confirmação experimental.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

No trabalho foram usados reagentes de elevado grau de pureza: ácido benzoico (*Sigma-Aldrich*, 242381), ácido clorídrico (*Riedel-de Haën* min37); ácido gálico (*Sigma-Aldrich*, 398225), cloreto de sódio (*ACROS*), eugenil benzoato (*Sigma-Aldrich*, CDS018047) eugenol (*Sigma-Aldrich*, E51791), fosfato de sódio monobásico (*Sigma-Aldrich*, S5011), fosfato de sódio dibásico (*Sigma-Aldrich*, 5136), heptano (*Sigma-Aldrich*, 32287), hexano (*Carlo Erba (SdS)*), kit de determinação proteína total, *Onishi-Barr* modificado (*Micro-Lowry*) (*Sigma-Aldrich*, TP0200-1KT), reagente de Biureto (*Sigma-Aldrich*, B3934), reagente de *Folin* (*Sigma-Aldrich*, F9252), solução de *p*-nitrofenol (*Sigma-Aldrich*, N7660), *p*-nitrofenil acetato (*Sigma-Aldrich*, N-8130), periodato de sódio (*Sigma-Aldrich*, 311448); propil galato (*Sigma-Aldrich*, 48710), 1-propanol (*Lab-Scan analytical sciences*). Foram usados também etanol destilado e água destilada.

3.2. Enzima

A enzima utilizada foi a CALB produzida por *Aspergillus niger* com uma concentração 5000 LU/g de solução. (*Sigma*, L3170), onde 1 LU corresponde à quantidade de solução enzimática necessária à libertação de 1µmol de ácido butírico por minuto, através de hidrólise da tributirina nas condições padrão [38]. A solução, além da enzima, tinha glicerol, sorbitol, água e vestígios de benzoato de sódio e sorbato de potássio [38].

3.3. Suporte de imobilização

A CB foi fornecida pelo CICECO/UA. A produção da CB foi preparada de acordo com o procedimento de Carreira et al. (2011) [39]. A CB foi cedida liofilizada em discos que foram recortados em pequenos pedaços como mostra a Figura 15.

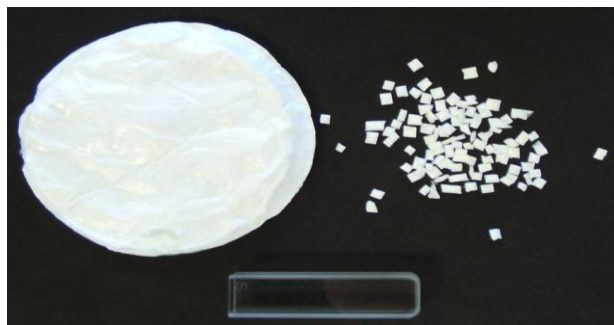


Figura 15-CB inteira e recortada (célula de quartzo 1cm)

3.4. Imobilização enzimática

As imobilizações foram efetuadas com soluções enzimáticas de CALB, 2mg/mL e 4mg/mL em solução tampão fosfato de sódio 0,05M (pH7,2) (Anexo A), o que correspondia a 43,2LU/mL e 86,4LU/mL da solução comercial, respetivamente.

3.4.1. Adsorção

Neste processo, 15mg de CB foram colocados em 3mL da solução enzimática com agitação (120rpm) à temperatura ambiente por cada teste. Foram testados quatro tempos de imobilização (2h, 4h, 8h e 16h) para cada solução enzimática (2mg/mL e 4mg/mL). Após imobilização, a CB foi lavada uma vez em 3mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05M (pH7,2) com agitação (120rpm) por 5min. As soluções enzimáticas após imobilização e as lavagens foram guardadas no frigorífico, para posterior quantificação de proteína total.

3.4.2. Ligação covalente

Este processo iniciou-se com a preparação da solução oxidante de periodato de sódio 0,02M em água destilada (Anexo A). De seguida procedeu-se à oxidação da CB.

Previamente, a CB foi lavada em água destilada durante 2h com agitação (120rpm), sendo cada 15mg de CB lavados com 5mL de água destilada. Após lavagem, a CB foi submersa na solução periodato de sódio 0,02M (5mL por cada 15mg CB) na ausência de luz, com agitação (120rpm) à temperatura ambiente por 6h30min [2,40]. No final da oxidação, a CB foi lavada três vezes com solução tampão fosfato de sódio 0,05M (pH7,2). O restante processo de imobilização, condições testadas e o armazenamento das amostras foram iguais à adsorção.

3.5. Quantificação de proteína total

A determinação de enzima imobilizada foi baseada na diferença de concentração de proteína total na solução enzimática utilizada, antes e depois do contacto com a CB. A quantificação de proteína total na lavagem serviu para determinar a quantidade de proteína libertada pela CB após imobilização.

Na determinação da proteína total foi usado o *kit* de *Onishi-Barr* modificado (*Sigma-Aldrich*, TP0200-1KT), que se baseia na aplicação do método de Lowry modificado. O procedimento usado baseou-se no procedimento apresentado no boletim técnico do *kit*, no entanto utilizaram-se metade das quantidades indicadas de todos os reagentes. As amostras foram diluídas com NaCl 0,85% para que tivessem uma concentração entre 150µg/mL e 1000µg/mL. Foi adicionado 0,1mL de amostra a 1,1mL de reagente de Biureto, num tubo de ensaio. Agitou-se no vortex e deixou-se repousar durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado ao tubo de ensaio 0,05mL de reagente de *Folin*. Agitou-se no vortex e deixou-se repousar durante 30 minutos. Por fim, foram lidas as absorvências das amostras a 728nm no espectrofotómetro em cuvetes de plástico. Para a determinação da concentração de proteína total foi usado o valor das absorvências, a reta de calibração e o fator de diluição respetivo. A reta de calibração foi determinada a partir dos valores de absorvência de quatro soluções de proteína padrão diluída (Anexo A), tendo estas soluções diluídas concentrações entre 150µg/mL e 1000µg/mL. A reta de calibração obtida foi a seguinte (Anexo C):

$$Absorvência = 0,00134 \times [proteína\ total] + 0,00349$$

$$R^2 = 0,99907$$

3.6. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi obtida através da reação de hidrólise em meio aquoso e à temperatura ambiente do éster *p*-nitrofenil acetato, que em meio básico origina um produto de cor amarela como mostra a equação seguinte:



A coloração amarela formada em solução foi medida por espectrofotometria UV em células de quartzo a 405nm.

3.6.1. Reta de calibração do *p*-nitrofenol

As soluções padrão da reta de calibração foram obtidas por diluição da solução comercial de *p*-nitrofenol 10mM numa solução de etanol e tampão fosfato de sódio 0,05M 1:1 (v/v), calibrada para pH7,2 com ácido clorídrico.

A reta de calibração foi construída a partir dos valores de absorvência de onze soluções padrão no intervalo de concentração 0,01mM a 0,5mM (Anexo A). A reta obtida foi a seguinte (Anexo B):

$$\text{Absorvência} = 5,0387 \times [p - \text{Nitrofenol}] + 0,0231$$
$$R^2 = 0,9999$$

3.6.2. Atividade da enzima livre

Para determinar a atividade da enzima livre foi preparada uma solução substrato *p*-nitrofenil acetato (4mM) em solução etanol/ tampão fosfato de sódio 0,05M 1:1 (v/v) pH 7,2 (Anexo A).

Como ensaio preliminar, para verificar a velocidade da reação com CALB foram adicionados 20μL da solução comercial de CALB em 2,50mL de solução substrato num tubo de ensaio. A mistura foi agitada no vortex por 3 segundos e passada para uma célula de quartzo que foi colocada no espectrofotômetro. A absorvência foi registrada de 10 em 10 segundos até se manter constante.

Para determinar a atividade específica da CALB livre foram adicionados 50μL de solução comercial diluída 100 vezes a 2,45mL de solução substrato num tubo de ensaio. A mistura foi agitada no vortex por 3 segundos e colocada no espectrofotômetro numa célula de quartzo. A absorvência foi registrada de 10 em 10 segundos durante 3 minutos.

3.6.3. Atividade da enzima imobilizada

Tal como foi realizado para a enzima livre, preparou-se uma solução substrato *p*-nitrofenil acetato (4mM) em solução etanol/ tampão fosfato de sódio 0,05M 1:1 (v/v) pH 7,2.

Na determinação da atividade da CALB imobilizada foram colocados 15mg de CB com enzima imobilizada (4mg/mL, 4h de imobilização) em 5mL de solução substrato num frasco de vidro (Anexo F: Figura 57). O meio reacional esteve sujeito a agitação magnética

(120rpm) durante 15 minutos. Amostras de 2mL de meio de reação foram retiradas do microrreator para leitura da absorvência (405nm) de 90 em 90 segundos. Após leitura, as amostras foram devolvidas rapidamente ao microrreator. No final dos 15 minutos, a CB foi lavada duas vezes por 2 minutos com agitação em 2,5mL de solução etanol/tampão fosfato de sódio 0,05M 1:1 (v/v) pH7,2. Este procedimento representa um ciclo de utilização e foi usado para as imobilizações por adsorção e ligação covalente (Anexo B), mas também com enzima livre para verificar a atividade específica por esta metodologia.

3.6.3.1. Efeito do armazenamento e utilização das imobilizações na atividade

Para estudar o impacto da armazenagem na atividade, foram estabelecidos dois grupos de imobilizações quanto à temperatura de armazenamento: imobilizações (adsorção e ligação covalente) no frigorífico (4°C) e imobilizações (adsorção e ligação covalente) no congelador (-18°C). Como teste de estabilidade operacional, as imobilizações conservadas no frigorífico foram submetidas a 13 ciclos e as imobilizações conservadas no congelador foram sujeitas a 15 ciclos. Foi calculada a atividade dos suportes ao longo dos ciclos.

A atividade enzimática foi representada em unidades de enzima (UI), que corresponderam à quantidade de enzima necessária para catalisar a libertação de 1µmol de *p*-nitrofenol por minuto. A atividade foi representada em UI por miligrama de suporte CB e em UI no total do microrreator. A atividade enzimática específica foi representada em UI por miligrama de proteína. A velocidade da reação não catalisada foi representada em µmol de *p*-nitrofenol por minuto no total do microrreator.

3.7. Lavagem das imobilizações (quantificação de proteína perdida)

A fim de quantificar a proteína libertada da CB, foram preparadas imobilizações por adsorção e ligação covalente (4mg/mL e 4h) e sujeitas a 5 ciclos de lavagem com 5mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,2 com agitação (120rpm). No final de cada ciclo foi guardada uma amostra da lavagem para quantificação da proteína libertada da CB. As amostras foram armazenadas no congelador (-18°C) até à quantificação da proteína. Foi realizada uma nova reta de calibração de proteína nesta etapa:

$$\begin{aligned} \text{Absorvência} &= 0,00116 \times [\text{proteína total}] + 0,39029 \\ R^2 &= 0,99389 \end{aligned}$$

3.8. Teste de retenção de soluções na celulose bacteriana

Para testar a capacidade de retenção foram submersas 15mg de CB em 3mL de duas soluções: solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,2 e solução enzimática 4mg/mL. O processo foi realizado durante 4h com agitação (120rpm) para cada solução.

As amostras de CB foram pesadas antes e depois das 4h de contacto com a solução. Através da diferença de massa foi determinada a quantidade de solução retida nos 15mg de CB. Após pesagem a CB foi colocada no exsiccador a desidratar, sendo pesada diariamente até a sua massa estabilizar. Pela diferença de massa inicial e após desidratação foi possível perceber que quantidade de sólidos ficou retida na CB durante o processo.

3.9. Análise à estrutura da celulose bacteriana

Para verificar as diferenças na estrutura da CB natural, oxidada e nas respetivas imobilizações enzimáticas por adsorção e ligação covalente (4mg/mL 4h) foram utilizadas duas técnicas. As amostras de CB foram previamente liofilizadas.

3.9.1. Microscopia eletrónica de varrimento

(SEM-Scanning Electron Microscopy)

As amostras de CB foram submetidas a duas deposições de carbono num evaporador de carbono a vacuum (*Emitech K950X*) e observadas no microscópio eletrónico de varrimento (*Hitachi SU-70*) usando 15,0kV.

3.9.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

(FTIR-Fourier transform infrared spectroscopy)

As amostras de CB foram analisadas por FTIR-ATR (FTIR-Attenuated Total Reflectance) (*Bruker tensor 27*) a fim de observar a oxidação de CB através da formação de grupos aldeído e carboxílicos, e a sua regeneração através da formação de grupos imina ou ligações amina após imobilização enzimática. Os espectros foram adquiridos com 256 varrimentos entre 4000 e 400cm⁻¹ com resolução espectral de 4cm⁻¹.

3.10. Esterificações em meio não convencional (Eugenil benzoato e Propil galato)

Nas esterificações foram usadas imobilizações (15mg CB) por adsorção (4mg/mL e 4h) desidratadas no exsiccador por 8h para todas as reações testadas. O tempo de reação foi 16h (noite) para todas as condições testadas (Tabela 6) com agitação magnética (120rpm). No final foram realizadas titulações com hidróxido de sódio para determinar a quantidade de ácido consumido durante a reação de esterificação. À amostra de meio reacional foram adicionadas três gotas de fenolftaleína (1%) como indicador e 3mL de etanol como agente de *quenching*. O rendimento da conversão dos ésteres foi calculado com base na quantidade de ácido consumido [28,33]. Para todas as reações foram realizados brancos. Também foram realizadas titulações de soluções padrão de propil galato e ácido gálico em propanol para verificar a eficiência da técnica.

Tabela 6-Reações testadas em diferentes condições na tentativa de síntese de eugenil benzoato e propil galato.

Reações	Solvente	Ácido	Álcool	Temperatura
Eugenil Benzoato (ácido benzoico + eugenol)				
1	10mL hexano	1,22mmol	1mmol	Ambiente
2	10mL hexano	1,22mmol	1mmol	50°C
3*	<i>10mL heptano</i>	<i>0,7mmol</i>	<i>2,1mmol</i>	<i>Ambiente</i>
4	<i>5mL eugenol</i>	<i>5mmol</i>	<i>32mmol</i>	<i>50°C</i>
Propil galato (ácido gálico + propanol)				
1*	10mL propanol	0,83mmol	134mmol	50°C
2*	<i>5ml heptano</i>	<i>0,7mmol</i>	<i>67mmol</i>	<i>50°C</i>

Nota *- estas condições foram realizadas também com enzima livre, 400LU da solução comercial.

Após a reação, alguns suportes foram recolhidos (reações a itálico), lavados em 5mL de solução etanol/ tampão fosfato de sódio 0,05M 1:1 (v/v) pH 7,2 por 10min com agitação (120rpm) e guardados no congelador (-18°C) em solução tampão fosfato de sódio 0,05M pH7,2.

3.11. Análise dos ésteres formados

3.11.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

(FTIR-Fourier transform infrared spectroscopy)

As amostras dos meios reacionais e padrões foram analisados por FTIR (Mattson 7000) de forma a verificar a presença dos ésteres por viragem do grupo carbonilo dos ácidos carboxílicos para o grupo carbonilo dos ésteres. 100µL de cada amostra foram absorvidos numa pastilha de 2mg de brometo de potássio. Os espectros FTIR foram obtidos após 128 varrimentos entre 4000 e 400cm⁻¹ com resolução espectral de 4cm⁻¹. O padrão propil galato foi analisado também por FTIR-ATR (*Bruker tensor 27*), assim como o padrão *p*-nitrofenil acetato. Este último foi analisado apenas para verificação dos picos característicos dos ésteres. Os espectros foram adquiridos com 256 varrimentos entre 4000 e 400cm⁻¹ com resolução espectral de 4cm⁻¹.

3.12. Cálculos

Os resultados foram apresentados como a média das réplicas, quando estas foram realizadas, e o erro experimental foi representado pelo desvio padrão. (Função (*DESVPAD*) do programa *Microsoft Office Excel* 2007).

4. Resultados e discussão

4.1. Imobilização de lipase B da *Candida antarctica* em celulose bacteriana

A primeira etapa do trabalho teve como objetivo encontrar as melhores condições de imobilização da CALB em CB por adsorção e ligação covalente, tendo como variáveis a concentração de solução enzimática e tempo de contacto da CB com a solução (já descritas na secção 3.4). Foi também considerada a perda de proteína após a 1ª lavagem do suporte.

4.1.1. Proteína imobilizada

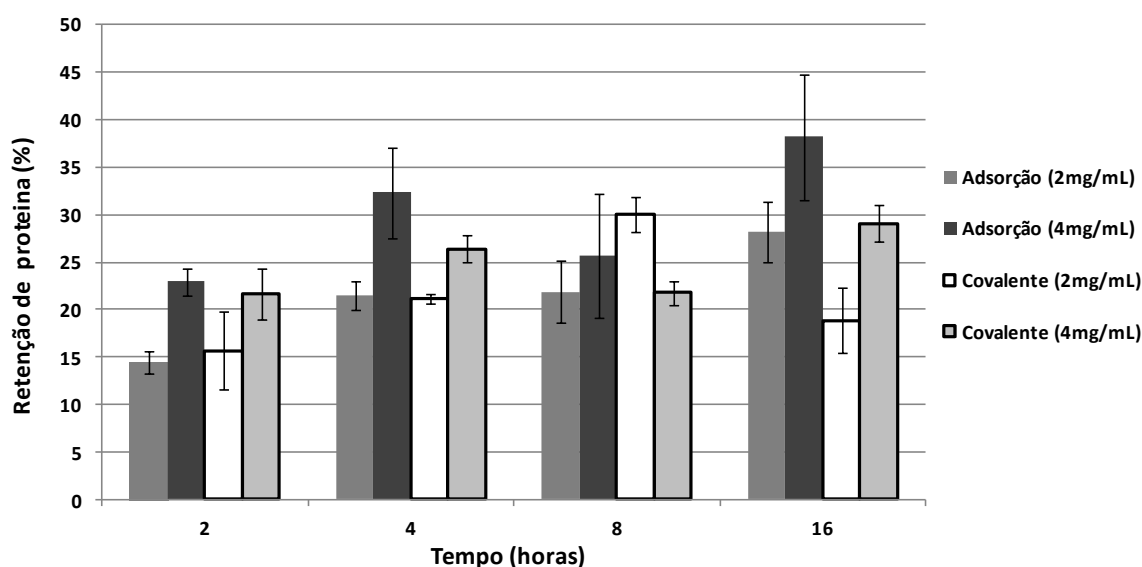


Figura 16-Retenção relativa (%) de CALB em CB.

A Figura 16 apresenta as retenções relativas de CALB (antes da lavagem) para todas as variáveis testadas. Com exceção das imobilizações com 2h e 2mg/mL que apresentaram valores de retenção inferiores a 20%, parece existir uma tendência para que as retenções relativas se situem entre os 20 e os 40%, tendo em conta os erros associados. Relativamente à adsorção, os resultados revelaram que em qualquer dos tempos utilizados, a maior concentração de enzima permitiu obter valores superiores de retenção. As melhores retenções de CALB por adsorção ocorreram para as 4h com 32% e para 16h com 38%. Tendo em conta o erro, para as 8h também foi possível atingir valores semelhantes. Para a ligação covalente com exceção das 8h, os resultados também mostraram que a maior concentração permitiu obter retenções superiores, para qualquer dos tempos de

imobilização. As melhores retenções de CALB por ligação covalente foram observadas às 8h e 2mg/mL com 30% (exceção) e às 16h com 29%, no entanto as 4h também apresentaram uma retenção próxima, com 26%. Brígida et al. (2008) conseguiram rendimentos de imobilização de CALB em fibras de coco muito semelhantes, cerca de 33% [41].

4.1.2. Proteína libertada na lavagem

A Figura 17 mostra a libertação relativa de proteína da CB durante a lavagem, após a imobilização, para todas as variáveis testadas.

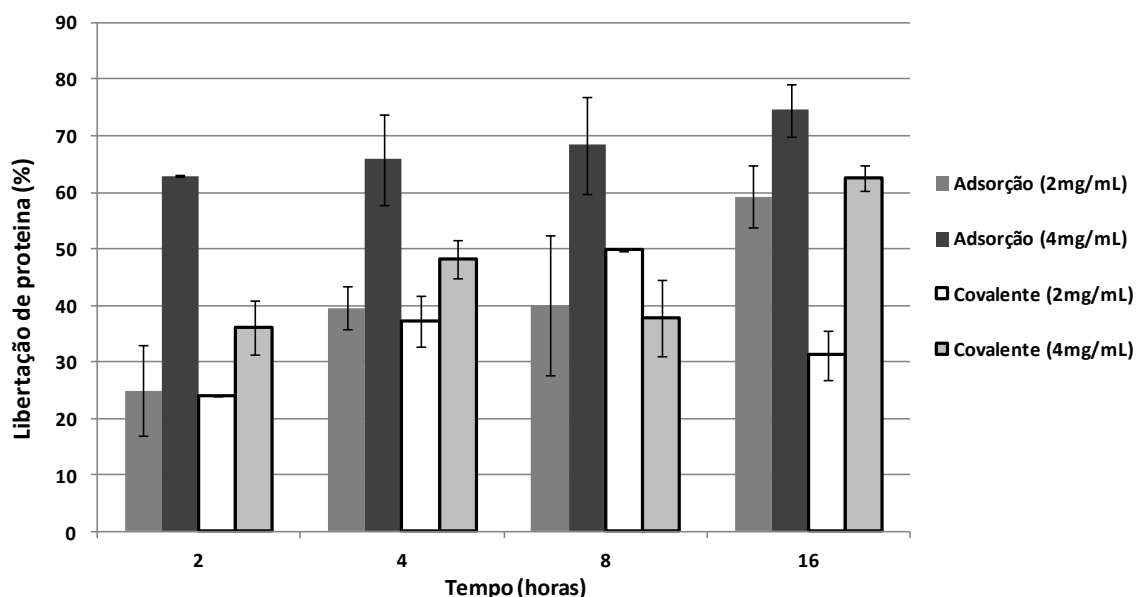


Figura 17-Libertação relativa (%) de CALB na lavagem.

No geral, os resultados revelaram que as condições que atingiram os maiores valores de retenção (Figura 16), corresponderam às que tiveram maior libertação de enzima com a lavagem, e que as que menos CALB retiveram, foram as que menos libertaram. No que diz respeito à adsorção, os resultados mostraram que para os 4mg/mL as perdas foram as maiores em todos os tempos testados (entre 63 e 75%). Em relação à ligação covalente, a libertação variou entre os 36% e 63%, revelando-se inferior em todos os tempos face à adsorção, para a concentração de 4mg/mL. As ligações covalentes obtiveram perdas menores de enzima também para a concentração mais baixa, à exceção das 8h. Apenas nas 16h foi possível observar uma diferença significativa de libertação de CALB entre a ligação covalente e adsorção para a concentração 2mg/mL. O facto das

imobilizações por ligação covalente terem revelado perdas inferiores de enzima corresponde ao teoricamente esperado, pois as ligações covalentes estabelecidas entre enzima e CB são mais estáveis que as que se estabelecem por adsorção, de natureza não covalente. Apesar disso, é preciso ter em conta que além das ligações covalentes entre enzima e suporte, devido à oxidação da CB, também existe a adsorção.

4.1.3. Quantidade de proteína imobilizada

Na Figura 18 é possível observar que as quantidades de proteína que ficaram retidas na CB foram influenciadas pela concentração utilizada nas imobilizações. Para ambas as imobilizações, a concentração 4mg/mL revelou quantidades superiores de enzima retida, após lavagem, face à concentração 2mg/mL.

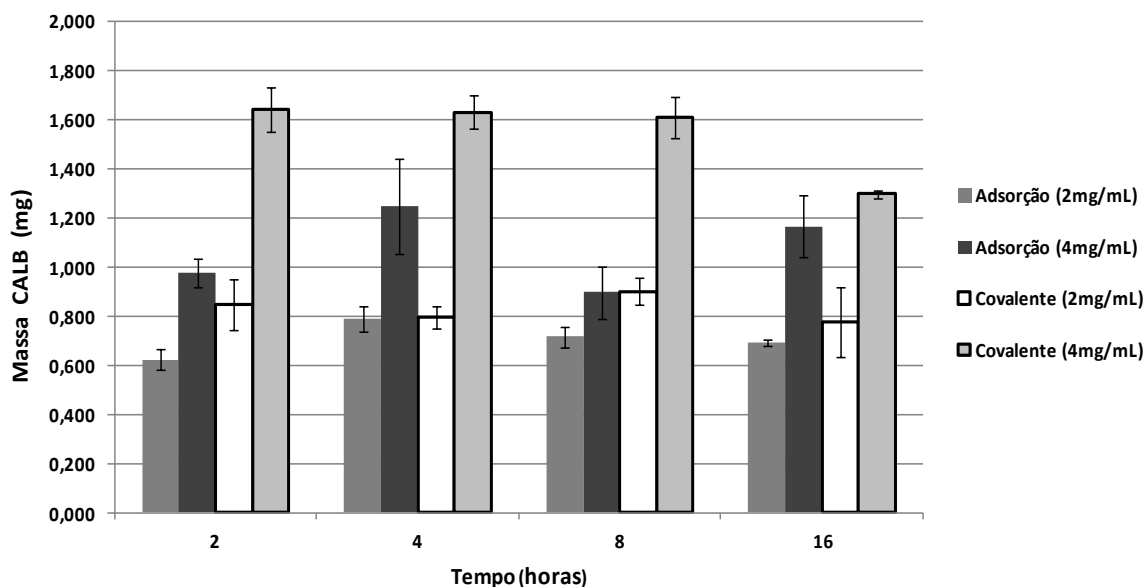


Figura 18-Massa de CALB (mg) retida na CB após lavagem.

Nos ensaios com ligação covalente e 4mg/mL observaram-se as maiores retenções de lipase, muito semelhantes para 2h, 4h e 8h (1,65mg, 1,63mg, 1,61mg respetivamente). Na adsorção, a maior quantidade de enzima retida surge nas 4h e 4mg/mL com 1,25mg. Desta forma a concentração de 2mg/mL foi preterida em função de 4mg/mL, que apresentou as maiores quantidades de proteína retida para ambas as imobilizações. As 16h foram excluídas, pois apresentaram elevadas perdas de proteína durante a lavagem, o que se refletiu na quantidade final de proteína retida para ambas as imobilizações. Isto pode estar relacionado com o desgaste físico da CB sujeita a mais horas de agitação, pois nas

amostras com 16h foram notados alguns filamentos de CB que se separaram, com maior predominância na CB sujeita a oxidação. Para a ligação covalente qualquer outro tempo foi indiferente na quantidade de proteína retida após lavagem, no entanto, tendo em conta que 2h foi o tempo com menores retenções relativas, e não sendo o melhor em termos de quantidade de enzima retida por adsorção, também foi excluído. As 4h e 8h para a adsorção tiveram resultados relativamente semelhantes em termos de retenção e libertação relativas, tendo em conta as barras de erro, mas a quantidade final de proteína retida foi superior para as 4h. Além disso realizar imobilizações em 4h representa uma poupança de tempo e energia no processo. As condições escolhidas para a fase seguinte foram a concentração enzimática de 4mg/mL e o tempo de 4h para ambos os métodos de imobilização.

4.2. Atividade enzimática

4.2.1. Influência do pH na quantificação de *p*-nitrofenol

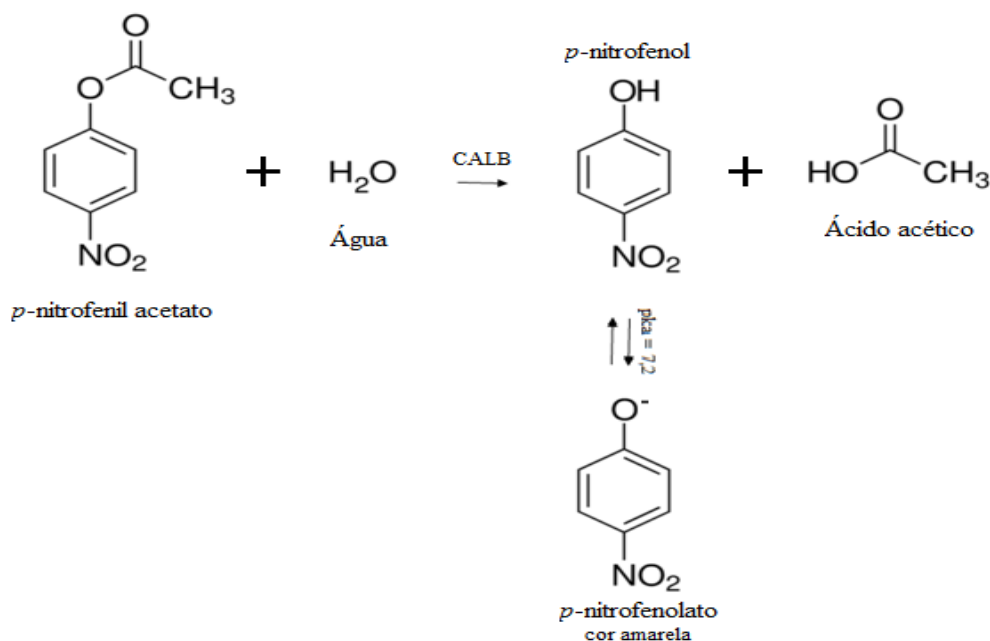


Figura 19-Hidrólise do *p*-nitrofenil acetato catalisada por CALB.

A atividade enzimática foi determinada através da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil acetato, que em meio aquoso básico origina um produto de cor amarela através da formação de *p*-nitrofenol. Na Figura 19 está representada a reação completa. O *p*-

nitrofenol é incolor, mas o produto da sua dissociação em meio básico causa o aparecimento da cor amarela (ião *p*-nitrofenolato). Foi realizada uma avaliação para perceber o impacto do pH nos valores de absorvência medidos para concentrações iguais de *p*-nitrofenol. Deste modo foram realizadas mais duas retas de calibração com seis padrões no intervalo 0,01 a 0,1mM de *p*-nitrofenol. Os valores de pH escolhidos foram 7,5 e 8.

Tabela 7-Retas de calibração de *p*-nitrofenol com diferentes pHs.

pH	7,2	7,5	8,0
Reta	$y=5,109x+0,0231$ $R^2=0,9999$	$y=10,109x+0,0425$ $R^2=0,9979$	$y=14,607x+0,0234$ $R^2=0,9960$

Os resultados obtidos mostraram que o pH tem grande influência nos valores obtidos, como se pode verificar pelo declive das retas de calibração (Tabela 7). Quanto maior o pH, mais intensa foi a cor amarela para a mesma concentração de *p*-nitrofenol, e consequentemente maior o valor de absorvência obtido. Desta forma foi possível saber que qualquer erro na calibração do pH da solução substrato poderia levar a resultados indesejados.

4.2.2. Enzima livre

Os ensaios de medição da atividade enzimática iniciaram-se com a determinação da atividade da enzima livre, que serviu como valor controlo para a atividade de enzima imobilizada pelos dois métodos. A atividade de CALB usando solução comercial não diluída, serviu para conhecer a velocidade em absorvência por minuto.

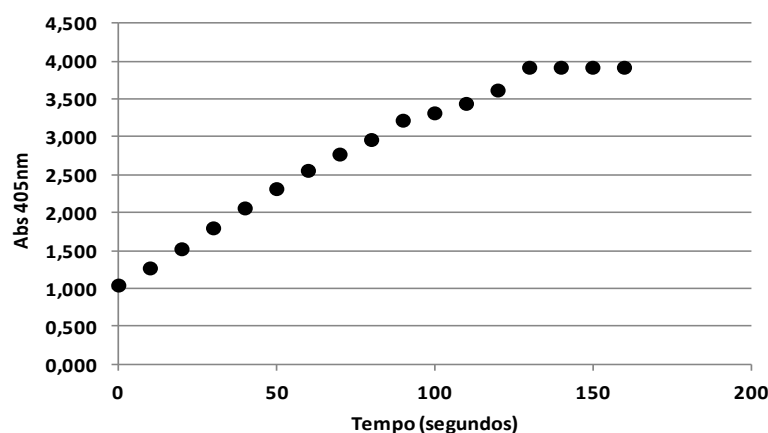


Figura 20-Atividade da CALB livre (não diluída). Absorvência em função do tempo.

A velocidade obtida foi 1,416 Abs/min, o que corresponde exatamente ao primeiro minuto, onde a velocidade foi constante. Depois dos 60 segundos passando os 2,500 Abs, ocorreu perda de velocidade até se manter constante dos 120 segundos em diante. Isto ocorreu, porque o limite de detecção do espectrofotómetro foi ultrapassado. O limite máximo de detecção é aproximadamente aos 2,550, como foi confirmado durante a construção da reta de calibração *p*-nitrofenol a pH 7,2. Tendo em conta o resultado obtido, foram preparadas diluições da solução comercial para determinar a atividade específica.

4.2.2.1. Atividade específica

As condições para a determinação da atividade específica foram descritas na secção 3.6 e com exceção do ensaio com enzima comercial não diluída, os ensaios foram realizados em triplicado. As atividades específicas obtidas apenas com agitação inicial no vortex e com agitação contínua no microrreator, similar à metodologia adotada com enzima imobilizada, foram muito próximas, como se pode observar na Tabela 8. Apesar de ligeiramente superior, a atividade específica não foi afetada significativamente pela agitação constante, ou pelo facto da enzima estar menos concentrada.

Tabela 8-Atividade específica da CALB à temperatura ambiente.

	Atividade específica (UI/mg de proteína)	Desvio padrão
Enzima livre comercial (teste único)	1308,473	-
Enzima (diluição 100x)	1336,364	34,591
Enzima livre c/ agitação (diluição 500x)	1340,480	8,004

Foi possível verificar que o método sem agitação contínua foi menos preciso (desvio padrão mais elevado), provavelmente pela falta de agitação. A atividade específica da enzima livre com base no ensaio único, realizado com a solução comercial não diluída, foi bastante próxima das obtidas com enzima diluída tendo em conta a curta duração do ensaio.

4.2.3. Enzima imobilizada

Depois de determinada a atividade específica da enzima livre, realizaram-se os ensaios de atividade com CALB imobilizada em CB por adsorção e ligação covalente.

4.2.3.1. Estabilidade operacional

As imobilizações foram sujeitas a ciclos sucessivos de utilização para testar a sua estabilidade operacional. As imobilizações armazenadas no frigorífico (4°C) foram sujeitas a 13 ciclos de utilização e as imobilizações armazenadas no congelador (-18°C) (G) foram sujeitas a 15 ciclos. Os ciclos de reação (15min) foram realizados à temperatura ambiente num microrreator, e determinada a atividade enzimática (UI) no microrreator para cada ciclo (Anexo B). Os ensaios foram realizados em triplicado, sendo o erro associado o desvio padrão.

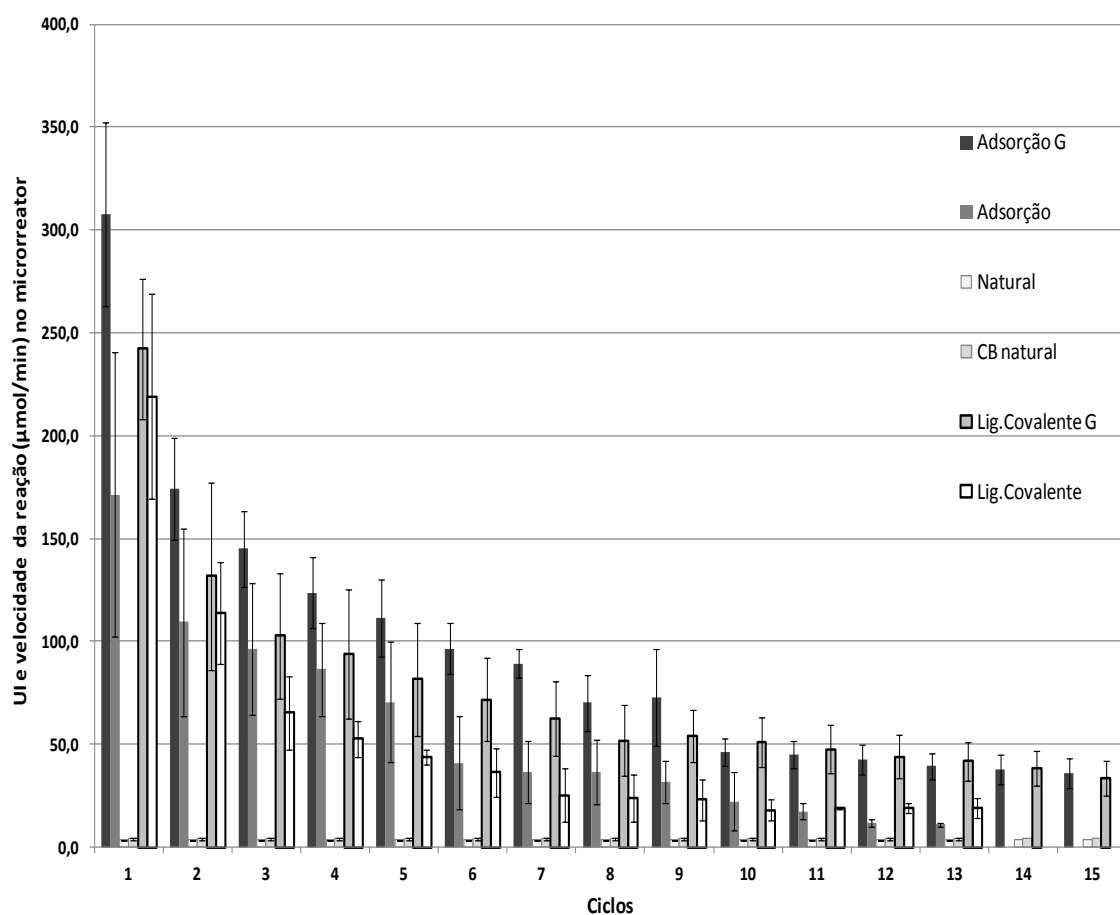


Figura 21-Atividade enzimática (UI) das imobilizações ao longo dos ciclos e velocidade da reação natural de formação de *p*-nitrofenol com e sem CB, num microrreator de 5mL.

A Figura 21 apresenta a atividade enzimática (UI) registada ao longo dos vários ciclos para todas as imobilizações, e a velocidade de reação não catalisada (natural), com e sem CB vazia, no microrreator.

Independentemente do método de imobilização ou armazenamento, do 1º para o 2º ciclo de utilização existiu uma redução acentuada de atividade para próximo de metade. Nos ciclos seguintes a atividade foi reduzindo progressivamente.

Os resultados revelaram que as imobilizações G possuíam sempre atividades superiores a qualquer outra do frigorífico. As atividades inferiores das imobilizações do frigorífico deveram-se em grande parte às paragens na realização dos ciclos. Sempre que se parou e guardou as imobilizações no frigorífico para continuar os ciclos no dia seguinte, ocorreram perdas médias de 50% em relação ao ciclo anterior. As paragens na realização dos ciclos das imobilizações do congelador não foram relevantes para a perda de atividade. As perdas registadas, após paragem, foram cerca de 2 a 3% da atividade registada no ciclo anterior, e algumas vezes observou-se aumento de atividade após paragem. Este facto revelou que a conservação e estabilidade da imobilização de CALB no suporte foram mais eficientes no congelador. Até ao 9º ciclo a adsorção G foi a que apresentou maior atividade. Do 10º até ao 15º ciclo a imobilização covalente G aproximou-se da adsorção G, sendo ligeiramente superior até ao 14º ciclo. Com exceção dos dois primeiros ciclos, também se observou uma superioridade da adsorção até ao 10º ciclo nas imobilizações do frigorífico, mas do 11º até ao 13º ciclo a ligação covalente teve atividade superior (Figura 21).

A Figura 22 permitiu avaliar a estabilidade operacional, pois com a atividade residual todas as imobilizações começaram nas mesmas condições, com o 1º ciclo a ser considerado como 100%. No 2º ciclo as imobilizações conservaram entre os 50% e 65%, sendo as adsorções ligeiramente mais estáveis que as ligações covalentes. Até ao 5º ciclo, a conservação nas adsorções foi sempre superior a qualquer ligação covalente. A imobilização covalente do frigorífico foi a menos resistente até ao 11º ciclo e no 5º ciclo apenas manteve 20% da atividade inicial, ao passo que todas as outras ainda mantiveram cerca de 30 a 40% da atividade residual. Do 6º até ao 9º ciclo, a conservação da ligação covalente G foi próxima da conservação das adsorções. Durante estes ciclos o erro associado à adsorção e ligação covalente do frigorífico foi especialmente elevado, resultado das paragens realizadas, predominantemente, antes destes ciclos. Do 10º ciclo até

ao final, a imobilização por ligação covalente G foi a mais resistente à perda de atividade, revelando-se a melhor ao final de 15 ciclos (13,8% de atividade residual).

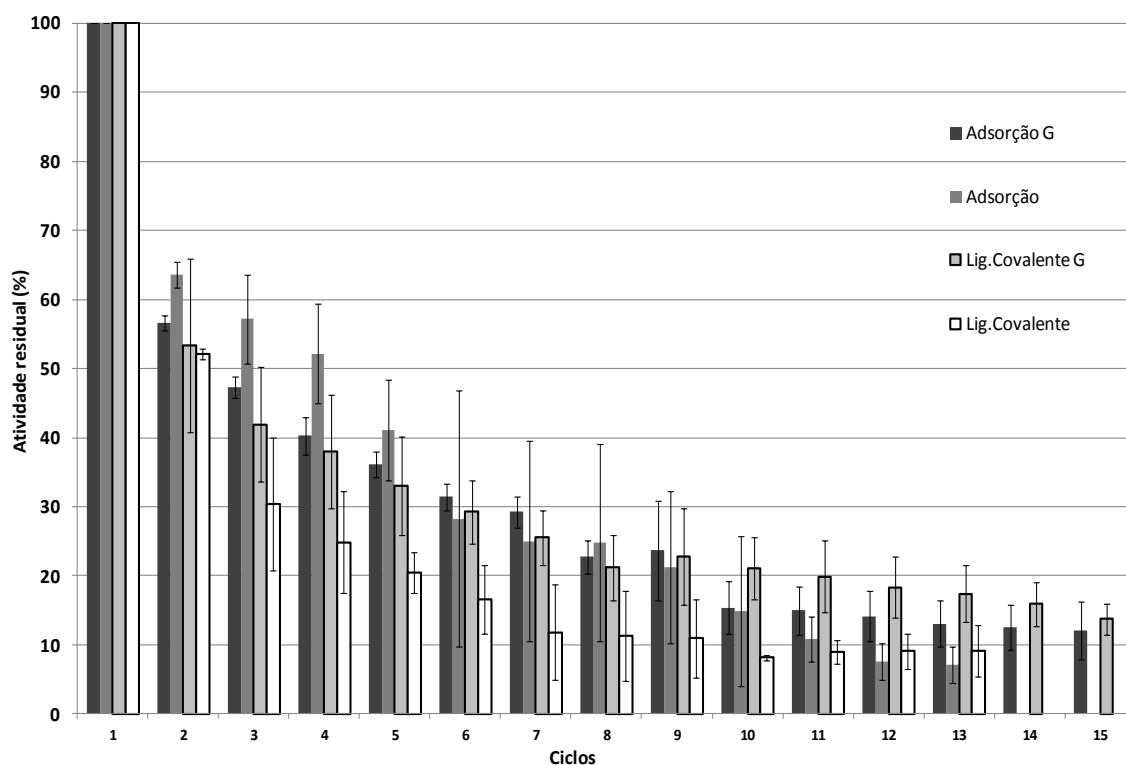


Figura 22-Atividade residual (%) ao longo dos ciclos.

A ligação covalente do frigorífico desde o 10ºciclo até ao 13ºciclo manteve a atividade residual constante (entre 8 e 9%), superando ligeiramente nos dois ciclos finais a adsorção do frigorífico, que se revelou a pior no final com 7% de atividade residual. A adsorção G do 10ºciclo até final perdeu apenas 3% de atividade e terminou como segunda mais resistente com 12,1% de atividade residual.

Na Figura 21 verifica-se a diferença entre a velocidade de reação natural e as imobilizações de forma gráfica. A Tabela 9 apresenta essa diferença de forma numérica para ser mais clara a perceção das diferenças. A velocidade da reação não catalisada (natural) de formação de *p*-nitrofenol ($3,450 \pm 0,117 \mu\text{mol/min}$ Figura 21) sem CB e com CB sem enzima ($3,978 \pm 0,637 \mu\text{mol/min}$ Figura 21) são bastante próximas. O erro superior associado à reação com CB deveu-se à libertação de alguns filamentos do suporte que interferiam nas leituras, especialmente em valores de absorvência mais baixos. Como se pode ver na Tabela 9, as imobilizações conservadas no frigorífico nunca conseguiram superar qualquer imobilização do congelador. Apesar de terem sido sujeitas a 14

utilizações e lavagens, ambas as imobilizações G potenciaram uma velocidade 10 vezes superior à natural ao 15ºciclo. Nas imobilizações do frigorífico a diferença final ao 13ºciclo é mais significativa, pois a imobilização ligação covalente apresentou 6 vezes a velocidade da reação natural, o dobro da obtida pela adsorção.

Tabela 9-Número de vezes que as imobilizações superaram a velocidade da reação não catalisada (natural).

Ciclo	Adsorção G	Adsorção	Lig. covalente G	Lig. covalente
1	89	50	70	64
2	50	32	38	33
3	42	28	30	19
4	36	25	27	15
5	32	20	24	13
6	28	12	21	11
7	26	11	18	7
8	20	11	15	7
9	21	9	16	7
10	13	6	15	5
11	13	5	14	6
12	12	3	13	6
13	11	3	12	6
14	11	-	11	-
15	10	-	10	-

Após análise dos resultados, ficou claro que guardar as imobilizações no congelador ofereceu vantagens na conservação, estabilidade e resistência operacional do sistema catalítico, devido à temperatura mais baixa. O tempo no frigorífico prejudicou a estabilidade enzimática, o que é natural, porque após imobilização e utilizações, apesar do suporte estar em solução tampão, as enzimas já não estão no ambiente preservante da solução comercial. O fabricante alerta que a solução enzimática original perde atividade com o tempo de frigorífico, sendo necessário usar mais solução para atingir a mesma velocidade do dia de abertura [38]. Se as enzimas se degradam à temperatura do frigorífico na solução protetora, na ausência dela essa degradação será maior, como aconteceu. Além

disso após utilização, mesmo lavando antes de guardar, a reação de hidrólise do *p*-nitrofenil acetato continuou à temperatura do frigorífico (4°C) com os restos que possam ter ficado retidos na CB, pois no dia seguinte, os frascos com as imobilizações tinham a solução tampão e as CBs completamente amarelas (Anexo F, Figura 56). Isto pode ter contribuído para o desgaste e perda de atividade das enzimas. A temperatura de congelação (-18°C) preveniu essa degradação. Depois da imobilização e durante os períodos de interrupção, a temperatura mais baixa do congelador pode ter ajudado a reduzir o espaço entre as fibras da CB criando uma malha mais apertada, dificultando a saída das enzimas adsorvidas. Os pedaços de CB que estiveram no congelador eram mais compactos, sólidos, apresentavam maior rigidez e consistência mecânica, quando comparados com os pedaços do frigorífico que eram muito menos rígidos e compactos.

Os resultados sugerem que durante os primeiros ciclos as perdas de atividade ocorrem principalmente por dessorção de enzimas dos suportes. As imobilizações covalentes têm nestes primeiros ciclos uma perda mais acentuada face às imobilizações por adsorção, muito provavelmente devido à degradação por oxidação a que estiveram sujeitas as CBs. As análises à estrutura por SEM revelaram muitas fibras partidas na CB oxidada e a abertura de espaços na estrutura fibrilar, o que não foi visível na CB não oxidada (secção 4.5.1). Isto facilitou a entrada de proteínas, mas não ajudou na retenção física das mesmas, podendo ser este o motivo da melhor performance das imobilizações por adsorção nos primeiros ciclos. Ao longo dos ciclos, as imobilizações covalentes também perderam mais filamentos, prova da degradação a que estiveram sujeitos os suportes de CB durante a oxidação. Isto foi particularmente visível nas imobilizações covalentes do frigorífico, o que pode justificar a perda rápida de atividade.

Nos ciclos finais as imobilizações covalentes começaram a ser mais resistentes à perda de atividade (Figura 22) e até superaram as adsorções, possivelmente, devido às imobilizações por ligação covalente já terem mais enzimas ligadas covalentemente do que adsorvidas, e portanto mais difíceis de perder. Isto verificou-se nas imobilizações do frigorífico, pois enquanto a imobilização por adsorção foi perdendo atividade de forma regular até final, a ligação covalente a partir do 7º ciclo quase parou de perder atividade (Figura 22), prova de que praticamente só teria enzimas ligadas covalentemente.

Yao et al. (2013) testaram a imobilização da enzima glutamato descarboxilase em CB por adsorção e ligação covalente usando gluteraldeído. Com 8 ciclos de 1 hora

testaram a resistência operacional das imobilizações através da produção de ácido aminobutírico por descarboxilação do ácido glutâmico em meio aquoso [26]. Na adsorção também se registou uma perda de cerca de 50% de atividade do 1º ciclo para o 2º ciclo, mas ao final de 5 ciclos a perda de atividade foi total. A estabilidade observada para a CALB adsorvida em CB foi muito superior, ao 5º ciclo os valores de atividade residual estavam muito próximos dos 40%. A imobilização por ligação covalente usando glutaraldeído revelou bastante estabilidade, ao final de 8 ciclos, pois perdeu apenas 5% da atividade registada no 1º ciclo [26]. A estabilidade da imobilização por ligação covalente G foi bastante pior ao 8º ciclo, sendo a perda de atividade cerca de 80%.

Huang et al. (2011) otimizaram a retenção de lipase da *Candida rugosa* em nano fibras de celulose por ligação covalente [2]. O método de oxidação das fibras de celulose foi similar ao usado neste trabalho com peróxido de sódio. A atividade das imobilizações foi testada através da hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato em meio aquoso, quantificando o *p*-nitrofenol [2], tal como já foi descrito neste trabalho. Foram realizados 8 ciclos de utilização e ao final no 3º ciclo a perda de atividade residual foi 50% do valor inicial, e no 8º ciclo obtiveram 30% da atividade inicial. A imobilização covalente G de CALB apresentou cerca de 20 a 25% da atividade inicial ao 8º ciclo, sendo ligeiramente pior, mas deve ser tido em conta que em Huang et al. (2011) cada ciclo teve a duração de apenas 5min [2], ao passo que os ciclos apresentados nesta tese tiveram a duração de 15min.

Brigida et al. (2008) experimentaram a imobilização por adsorção de CALB em fibras de coco e testaram a atividade através da hidrólise em meio aquoso de metil butirato por 11 ciclos de 24h. Em paralelo fizeram o mesmo com a imobilização comercial da CALB (*Novozym*® 435) [41]. Ao 3º ciclo a imobilização em fibra de coco apresentou 50% da atividade inicial e ao 7º ciclo 30%. No 8º ciclo as fibras de coco não revelaram qualquer atividade catalítica e assim se mantiveram até ao ciclo final. A *Novozym*® 435 ao final de 11 ciclos ainda apresentou atividade residual superior a 70% do valor inicial, revelando uma estabilidade muito superior [41]. As adsorções de CALB apresentaram atividade até ao 15º ciclo com cerca de 12% de atividade inicial, mas não é possível fazer uma comparação justa tendo em conta os 15min por ciclo, face às 24h. Mesmo com 24h por ciclo, a *Novozym*® 435 foi muito mais estável que melhor imobilização em CB apresentada nesta tese ao 11º ciclo, que apresentou apenas 20% da atividade inicial.

4.2.3.2. Influência do tempo e tipo de armazenamento

Este estudo foi realizado para perceber se o tempo de armazenamento das imobilizações no frigorífico e no congelador alterou a qualidade das mesmas. A Figura 23 apresenta a atividade (UI/mg CB) das 3 réplicas de cada imobilização, em função do número de dias que estiveram armazenadas até serem utilizadas pela 1ª vez. A temperatura ambiente do 1º ciclo para cada réplica também está apresentada.

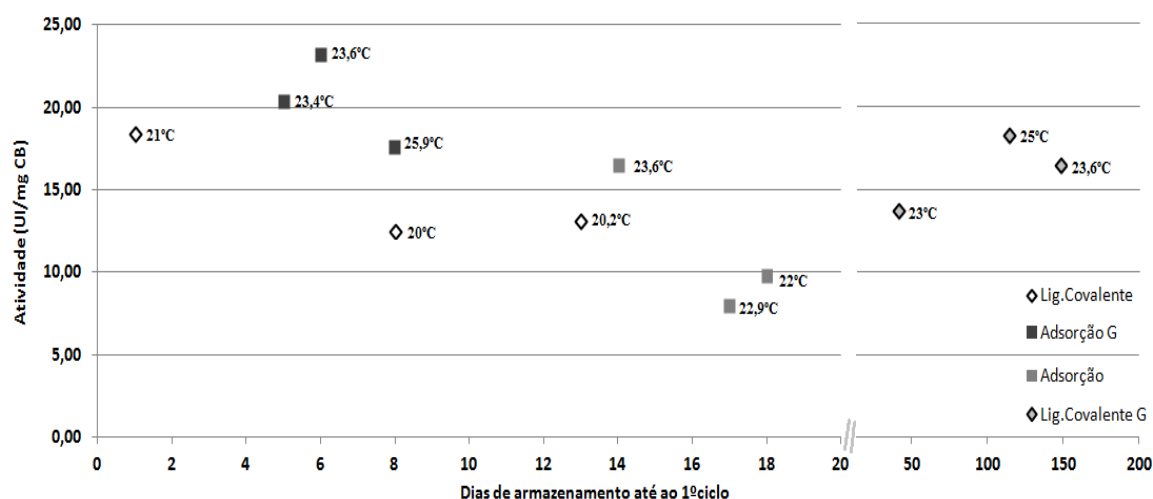


Figura 23-Atividade (UI/mg CB) em função dos dias de armazenamento até ao 1º ciclo, para as 3 réplicas de cada imobilização.

A relação entre o tempo de armazenamento (Figura 23) e a atividade do 1º ciclo das imobilizações, não foi clara para todas as condições testadas. No que diz respeito às imobilizações por ligação covalente do frigorífico, existiu uma diminuição de atividade com o tempo, mas terá estado relacionada com a diminuição da temperatura. As imobilizações por ligação covalente do congelador (G), apesar dos vários dias que as separam, não revelaram perdas de atividade e as diferenças pareceram estar relacionadas com a temperatura, visto que a réplica realizada a 25°C foi a que apresentou maior atividade. No entanto, ciclos seguintes revelaram que no intervalo de temperaturas entre 20,5°C e 26°C não existiram diferenças significativas de atividade entre as réplicas para o mesmo ciclo. Tendo em conta a diferença de temperatura a que foram realizadas as imobilizações por ligação covalente do frigorífico e do congelador, parece ter existido alguma perda de capacidade enzimática nas guardadas no congelador, o que não se confirmou. Os ciclos seguintes realizados numa temperatura ambiente de 20°C revelaram

atividades inferiores a ciclos correspondentes realizados a temperaturas superiores a 23°C. Em relação às imobilizações por ligação covalente (G), o tempo de armazenamento não diminuiu a atividade mesmo depois de 100 dias no congelador. Em Huang et al. (2011) [2], ao final de 7 dias de armazenamento as imobilizações covalentes de lipase da *Candida rugosa* em nanofibras de celulose tiveram menos 40% da atividade que as imobilizações do 1º dia, e igual resultado apresentaram as armazenadas após 30 dias [2]. Nas imobilizações por adsorção (G) nada se pode concluir, nem tendo em conta a temperatura, pois os ciclos seguintes correspondentes a temperaturas entre 22 e 26°C, não apresentaram diferenças relevantes de atividade. Em alguns casos para o mesmo ciclo, temperaturas inferiores apresentaram atividades superiores. As adsorções guardadas no frigorífico revelaram perda de atividade quando guardadas por mais de 16 dias.

4.3. Quantificação da proteína perdida nos ciclos de lavagem

Foram realizados 5 ciclos de lavagem com imobilizações por adsorção e ligação covalente, nas condições já descritas na secção 4.3, para quantificar a proteína libertada dos suportes em cada lavagem e relacionar com as perdas de atividade observadas durante os ciclos de utilização. Os ensaios foram realizados em triplicado e na Tabela 10 estão apresentados os resultados acompanhados do respetivo erro.

Na primeira lavagem a adsorção perdeu cerca de 1622µg de proteína, aproximadamente metade do retido inicialmente. Na ligação covalente houve uma perda próxima de 1272µg de proteína correspondendo a 32% da proteína inicial. Estes valores não são muito distantes da perda de atividade residual observada do 1ºciclo para o 2ºciclo, que foi entre os 40 e os 50% (Figura 22). As imobilizações por ligação covalente apresentaram, nestas lavagens, uma perda ligeiramente inferior esperado, uma vez que do 1º para o 2ºciclo também revelaram perdas de atividade na ordem dos 40 a 50% (Figura 22).

Como se pode observar na Tabela 10, a partir da 2ªlavagem a proteína perdida não foi suficiente para o limite de deteção do método adotado, o que era esperado, porque após a grande perda de atividade do 1º para o 2ºciclo, as perdas de atividade são reduzidas, o que sugeria uma perda de proteína muito inferior entre os ciclos seguintes.

Tabela 10-Quantidade de proteína (µg) perdida nos ciclos de lavagem.

µg de proteína		
Lavagens	Adsorção	Lig. Covalente
Proteína retida inicialmente	3242,54 ($\pm 95,67$)	3974,36 ($\pm 192,05$)
1	1622,36 ($\pm 165,48$)	1272,36 ($\pm 170,04$)
2	<u>-62,36 ($\pm 50,40$)</u>	<u>-204,03 ($\pm 54,38$)</u>
3	<u>-191,53 ($\pm 70,87$)</u>	<u>-429,03 ($\pm 21,38$)</u>
4	<u>-317,92 ($\pm 25,35$)</u>	<u>-509,5 ($\pm 76,38$)</u>
5	<u>-423,47 ($\pm 42,56$)</u>	<u>-541,53 ($\pm 105,85$)</u>

Como não foi possível quantificar a quantidade de proteína nos suportes de CB ao longo dos ciclos, esta foi estimada através da atividade revelada pelos suportes recorrendo à atividade específica da enzima livre (1340,480 UI/mg) nos ensaios do microrreator (Figura 24).

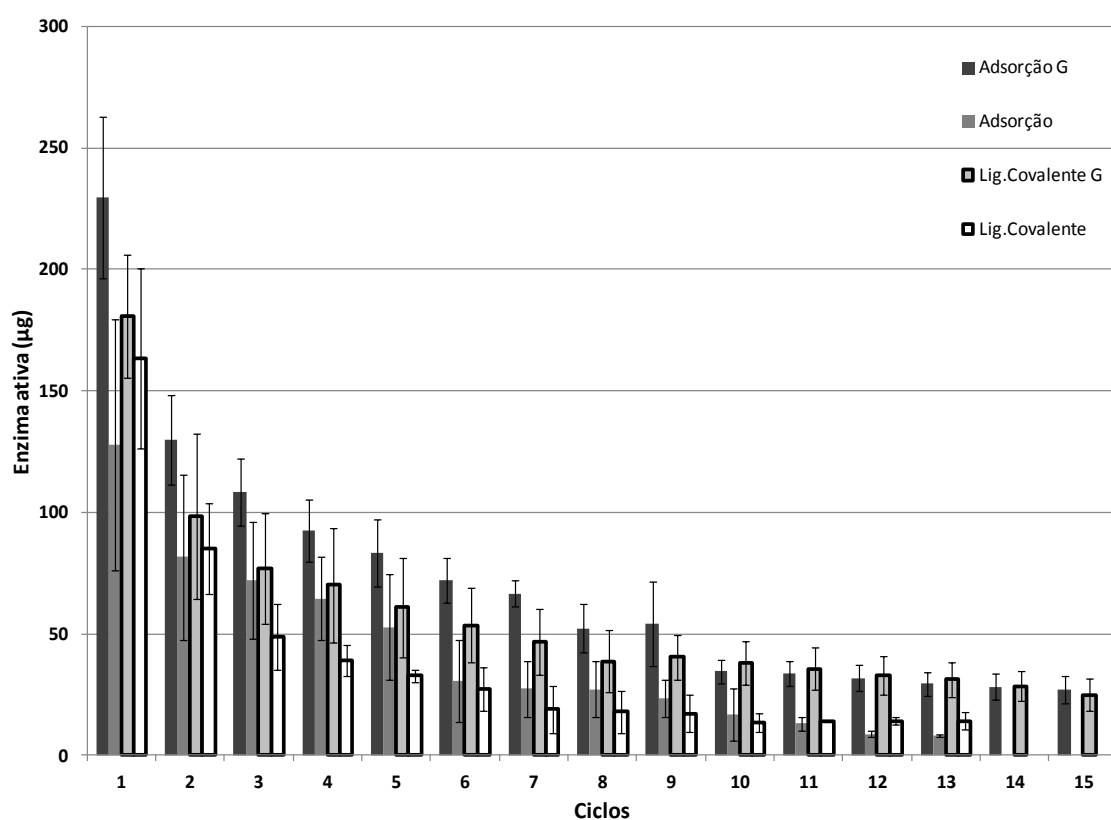


Figura 24-Quantidade de CALB (µg) ativa imobilizada ao longo dos ciclos.

A quantidade de enzima ativa nos suportes é muito inferior à quantidade dada como retida pelo método de biureto. O 1º ciclo de atividade foi realizado após uma lavagem dos suportes, logo a quantidade de enzima nestes seria superior a 1000µg (Figura 18 e Tabela 10), o que não se refletiu nas atividades. A quantidade de enzima ativa situou-se em valores muito inferiores por volta dos 150 a 250µg (Figura 24). Tendo em conta esta gama de valores de enzima ativa ao longo dos ciclos (<100µg), mesmo que existisse perda total de proteína, ainda estaria abaixo do limite mínimo de deteção do método. Estes valores muito inferiores podem ser explicados se tiver existido elevada agregação de enzimas no interior do suporte [37]. Havendo agregação, o centro ativo das enzimas fica inacessível ao substrato e os movimentos do próprio centro ativo ficam limitados mesmo que esteja acessível, isto provoca inibição e inativação das enzimas.

4.4. Teste retenção de soluções em celulose bacteriana

O teste de retenção de soluções foi realizado para verificar a capacidade de absorção da CB e de que forma estava relacionada com a retenção de sólidos presentes nas soluções. Foram usadas duas soluções (solução tampão e solução enzimática 4mg/mL) e realizadas 3 réplicas com cada solução de acordo com as condições referidas na secção 3.8.

A Tabela 11 apresenta a massa (g) de CB inicial, depois da retenção das soluções (CB húmida), o número de vezes que a massa aumentou e a massa final após desidratação. A CB conseguiu reter entre 42 a 76 vezes a sua massa de solução tampão, e entre 41 e 55 vezes a sua massa de solução enzimática, sem escorrer ou pingar. Este resultado confirma a grande capacidade de retenção de água da CB. Como se verifica na Tabela 11, apesar de as amostras iniciais de CB terem massas bastante próximas isso não garantiu que os valores de retenção de solução fossem tão próximos entre si, o que se refletiu também na massa final após desidratação. Este facto pode ajudar a justificar parte do erro associado à diferença na quantidade de proteína retida, mas também na variação e perda de atividade. A diferença na quantidade de solução retida poderá estar relacionada com a densidade das fibras, pois durante o trabalho verificou-se que não é uniforme em toda a CB. Após hidratação foi possível observar uma estratificação, zonas mais escuras e zonas mais claras nas laterais dos cubos de CB, prova de que não é um material de densidade uniforme. Com os resultados obtidos é possível concluir que uma maior retenção de solução também significa uma maior quantidade de sólidos retidos na estrutura da CB.

Tabela 11-Massa da CB antes e depois da retenção das soluções e após desidratação.

Teste	Massa CB (g) inicial	CB húmida(g)	Aumento de massa da CB (nºvezes massa inicial CB)	CB seca (g) final
Solução tampão fostato sódio 0,05M (densidade≈1,008g/mL)				
A	0,0150	0,8851	59	0,0215
B	0,0151	1,1544	76	0,0233
C	0,0148	0,6166	42	0,0164
Solução enzimática 4mg/mL (densidade ≈ 1,031g/mL)				
D	0,0148	0,8088	55	0,0951
E	0,0152	0,7240	48	0,0865
F	0,0152	0,6258	41	0,0774

4.5. Análise estrutural da celulose bacteriana

4.5.1. Análise por SEM

A morfologia da CB normal e oxidada foi analisada por SEM, antes e depois da imobilização, para verificar a existência de alterações na estrutura da CB. As imagens recolhidas podem ser observadas nas figuras seguintes.

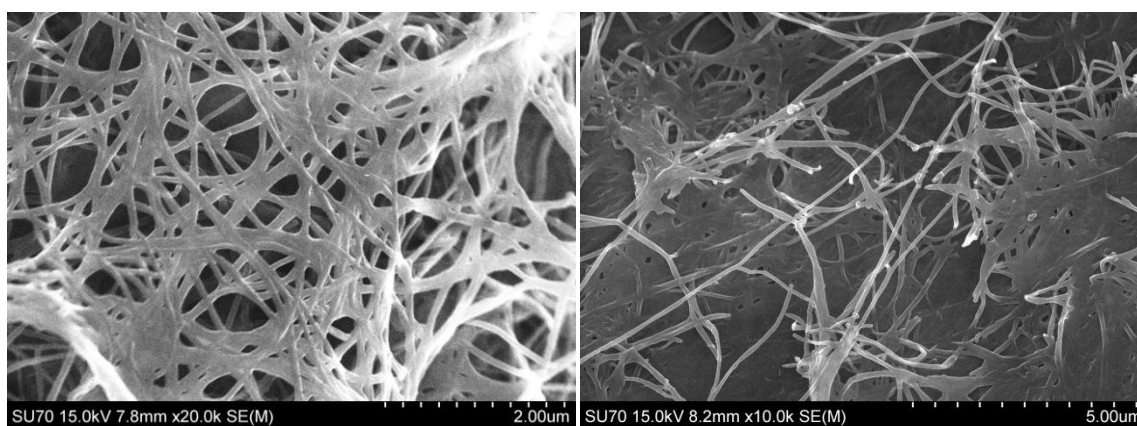


Figura 25-Esquerda: fibras de CB não oxidadas. Direita: fibras de CB oxidadas.

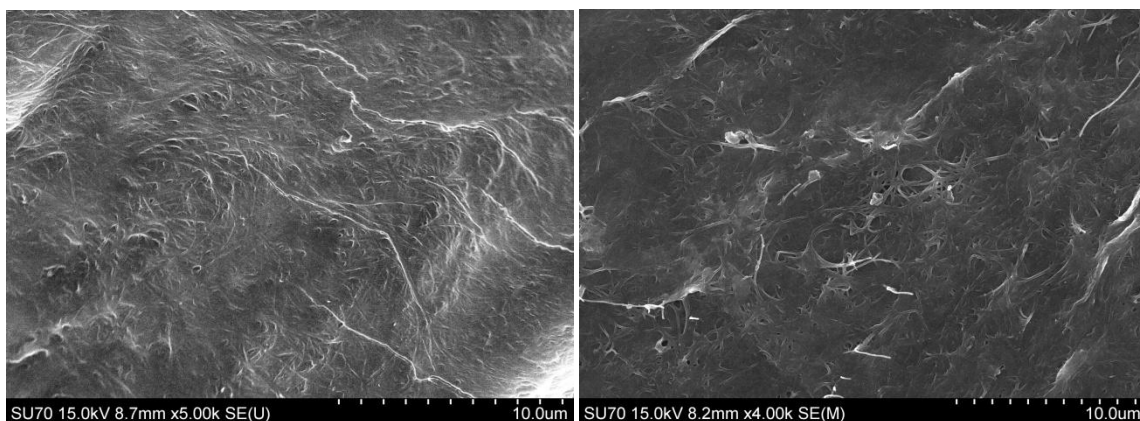


Figura 26-Esquerda: superfície de CB não oxidada. Direita: superfície de CB oxidada.

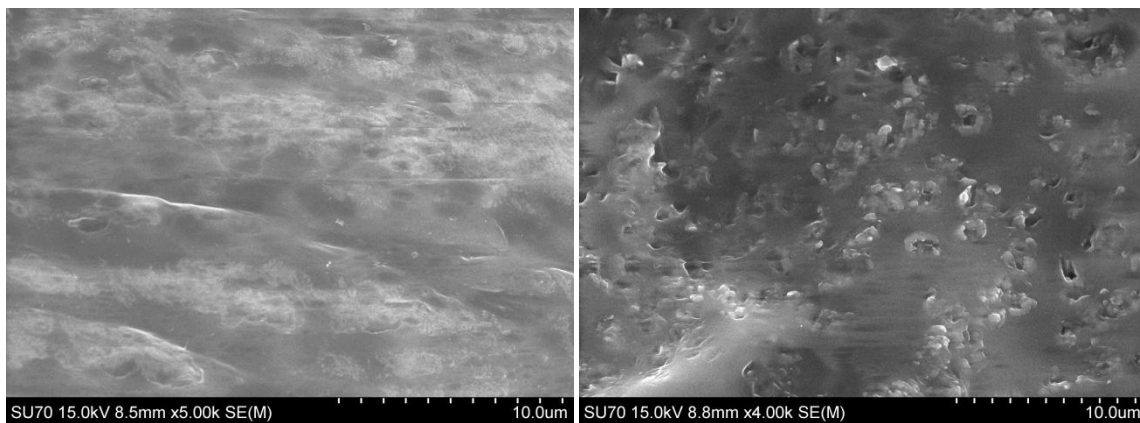


Figura 27-Superfícies CB-Esquerda: imobilização por adsorção. Direita: imobilização por ligação covalente.

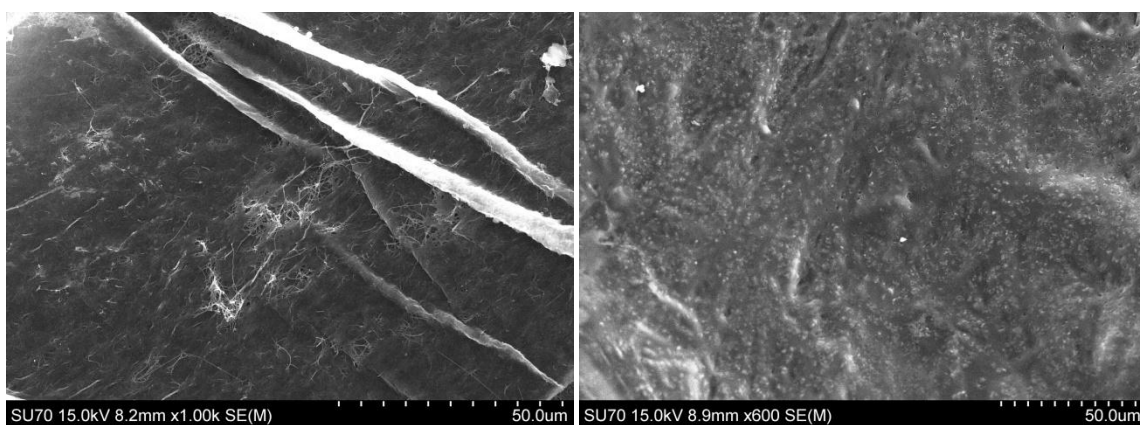


Figura 28-Esquerda: superfície CB oxidada. Direita: superfície após imobilização por ligação covalente.

Como se pode observar nas Figuras 25, 26 (à direita) e 28 (à esquerda), a oxidação degradou a estrutura da CB, abrindo espaços entre as fibras e à superfície, permitindo a

libertação de filamentos de celulose durante os ciclos de utilização das imobilizações por ligação covalente, e a perda superior de atividade durante os primeiros ciclos.

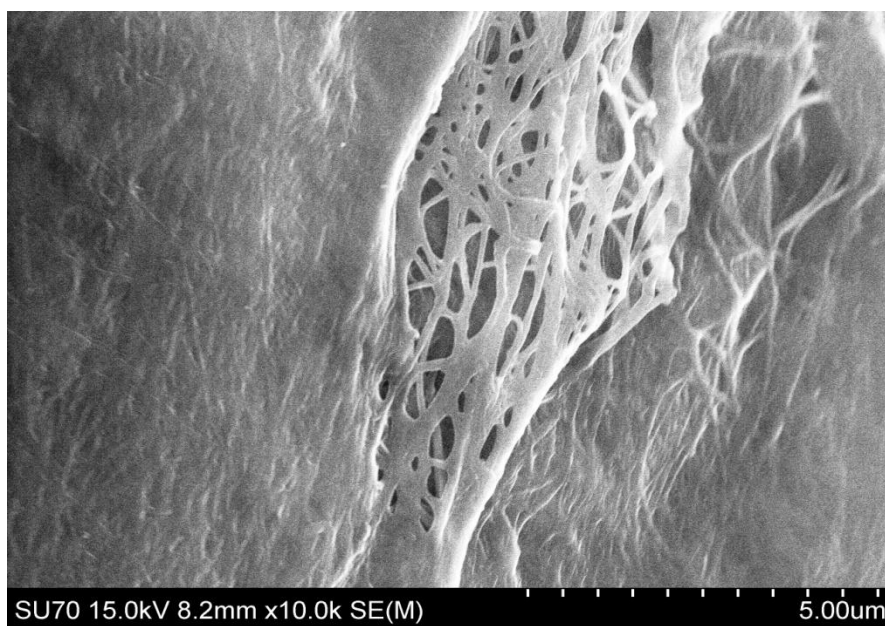


Figura 29-CB não oxidada com vista para o interior e à superfície.

Na Figura 27 é possível observar que durante o processo de imobilização foi criado um filme à superfície dos suportes de CB. No caso da CB não oxidada observou-se um filme liso e regular (Figura 27 (à esquerda)), já na CB oxidada como se formaram aberturas e exposição das fibras à superfície, o filme criado foi irregular apresentando saliências e sulcos (Figura 27 e 28 (à direita)). Na Figura 29 é possível notar claramente, a diferença entre a sua superfície plana com fibras compactas e o interior rendilhado da CB.

4.5.2. Espectro FTIR-ATR da celulose bacteriana nos diferentes estados

O FTIR-ATR foi utilizado para analisar as diferenças na composição da CB normal e oxidada, antes e depois da imobilização. Na Figura 30 estão apresentados os espectros da CB normal, oxidada e após imobilização enzimática por adsorção e ligação covalente, respetivamente.

No espectro da CB normal é possível identificar vários picos: o pico 3300 cm^{-1} está associado às vibrações da distensão das ligações O-H, o que significa estes grupos estabelecem pontes de hidrogénio na estrutura de celulose. Normalmente, estas ligações

surgem entre os 3600 e os 3700 cm^{-1} quando não estão associadas a pontes de hidrogénio [42].

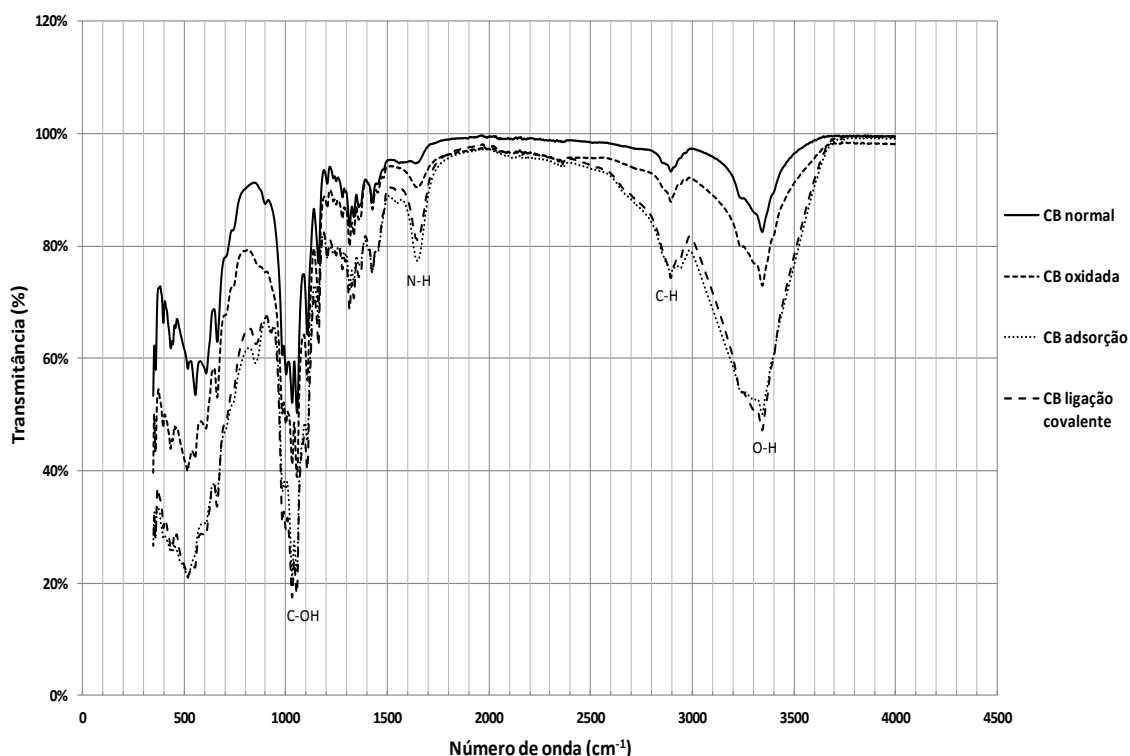


Figura 30-Espectros FTIR-ATR das amostras de CB normal, oxidada e após imobilização por adsorção e ligação covalente.

O pico 2891 cm^{-1} está relacionado com a distensão das ligações C-H [43], o pico 1030 cm^{-1} está relacionado com a vibração da distensão da ligação C-OH, característica dos álcoois primários presentes na estrutura da CB [42]. No espectro da CB oxidada também surgiram todos os picos apresentados na CB normal, mas ligeiramente mais intensos, possivelmente, resultado de alguma hidratação, pois apresenta um ligeiro pico aos 1647 cm^{-1} que não podendo representar ligações imina ou amina, só pode significar a torção de ligações O-H de água absorvida [43]. No espectro da CB oxidada deveria ter surgido um pico por volta dos 1750 cm^{-1} [2], característico da presença de grupos carboxílicos (C=O) [43], pois pelas imagens SEM provou-se que ocorreu oxidação.

O pico 1649 cm^{-1} que surge de forma intensa nas CB com enzima imobilizada pode estar associado à presença de ligações amina da proteína e/ou ligações imina ($-\text{C}=\text{N}$) [44], pois é um pico característico da presença de proteínas [45]. O facto de os outros picos terem sido mais intensos, está relacionado com a presença do glicerol e sorbitol existentes na solução enzimática [45]. De 750 a 950 cm^{-1} existiu a formação de um pico nas CB com

enzima imobilizada, esta diferença deveu-se à presença do sorbitol que tem um espectro semelhante nesta região [45].

4.6. Síntese dos ésteres (eugenil benzoato e propil galato)

Nesta fase foi usada enzima livre e a imobilização por adsorção na síntese dos ésteres, porque apresentou maior estabilidade operacional durante os primeiros ciclos e por ser a imobilização mais rápida de preparar. As reações em microrreator foram realizadas nas condições referidas na secção 3.10.

4.6.1. Eugenil benzoato

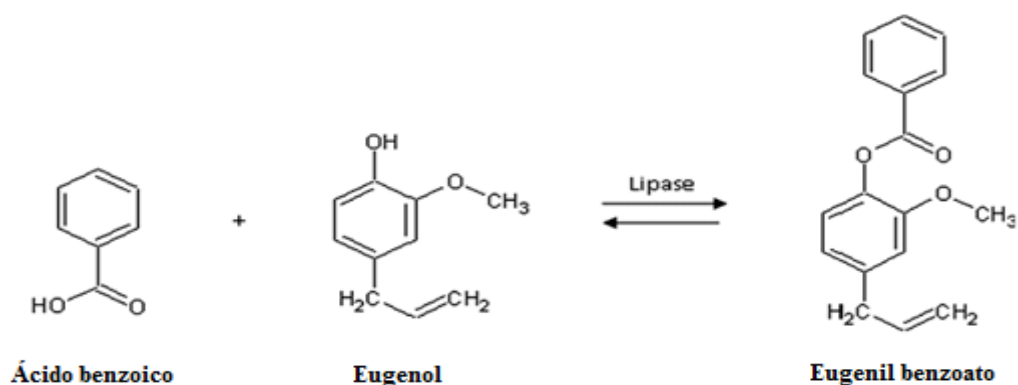


Figura 31-Síntese do Eugenil benzoato

Na síntese de eugenil benzoato foram testadas diferentes condições de operação em microrreator apresentadas na Tabela 12. No final da reação os meios reacionais foram analisados por titulação e por FTIR. Os métodos de análise do eugenil benzoato basearam-se na publicação de Horchani et al. (2010) [28] para a titulação e na publicação de Chaibakhsh et al. (2012) [30] para o FTIR.

Tabela 12-Condições testadas na síntese de eugenil benzoato.

Reações	Solvente	Ácido	Álcool	Temperatura
Eugenil Benzoato (ácido benzoico + eugenol)				
1	10mL hexano	1,22mmol	1mmol	Ambiente
2	10mL hexano	1,22mmol	1mmol	50°C
3*	10mL heptano	0,7mmol	2,1mmol	Ambiente
4	5mL eugenol	5mmol	32mmol	50°C

Nota*- estas condições foram realizadas também com enzima livre, 400LU da solução comercial.

As titulações realizadas não revelaram qualquer consumo de ácido benzoico durante as reações. A quantidade de solução hidróxido de sódio usada para titular os brancos, até se atingir a cor rosa do indicador, foi igual para as reações. O volume de titulante utilizado na prática foi similar ao teórico, determinado previamente através dos cálculos para ausência de reação. Tendo por base as titulações, a única conclusão foi a inexistência de consumo de ácido, logo ausência da síntese do éster eugenil benzoato.

Para verificar os resultados obtidos por titulação foram analisados os meios reacionais por FTIR. Os espectros FTIR para os meios das reações 1 e 2 não foram realizados.

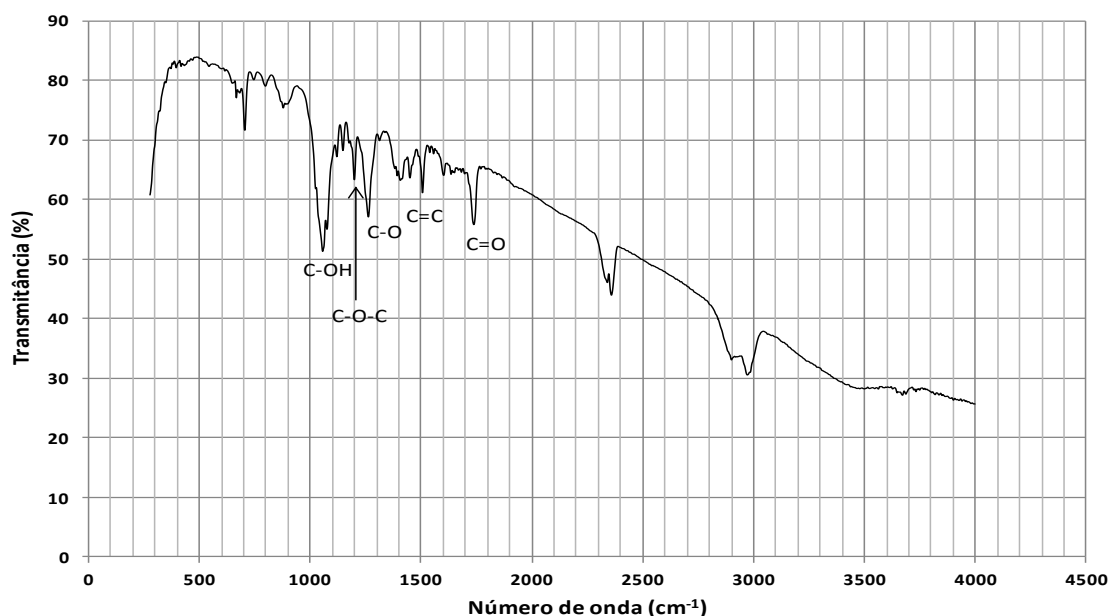


Figura 32-Espectro FTIR do padrão eugenil benzoato.

Na Figura 32 está o espectro do padrão eugenil benzoato que, como esperado, apresentou os picos característicos de um éster. Nos 1739 cm^{-1} surgiu o pico da ligação do grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), e aos 1200 cm^{-1} e 1260 cm^{-1} as vibrações de alongamento da ligação $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ e as ligações $\text{C}-\text{O}$, respetivamente. Nos 1501 cm^{-1} surgiram representadas as ligações duplas dos anéis aromáticos ($\text{C}=\text{C}$) do eugenil benzoato. O pico aos 1055 cm^{-1} está relacionado com as ligações $\text{C}-\text{OH}$ do etanol, usado como solvente.

Por comparação do espectro do padrão eugenil benzoato com os espectros dos brancos e das reações foi possível notar em comum: a presença do pico 1501 cm^{-1} das ligações duplas dos anéis aromáticos do ácido benzoico e do eugenol e o pico 1033 cm^{-1}

das ligações C-OH, mas do eugenol. Também foi possível observar um pequeno pico aos 1200cm^{-1} da ligação C-O-C do eugenol. Como era esperado e se verificou, nos espectros dos brancos, o grupo carbonilo característico do éster não surgiu, sendo substituído pelo pico 1691 cm^{-1} representante da ligação C=O do grupo carboxílico do ácido benzoico. Nos espectros das reações também não surgiu o pico C=O do éster, confirmando os resultados das titulações (ausência esterificação).

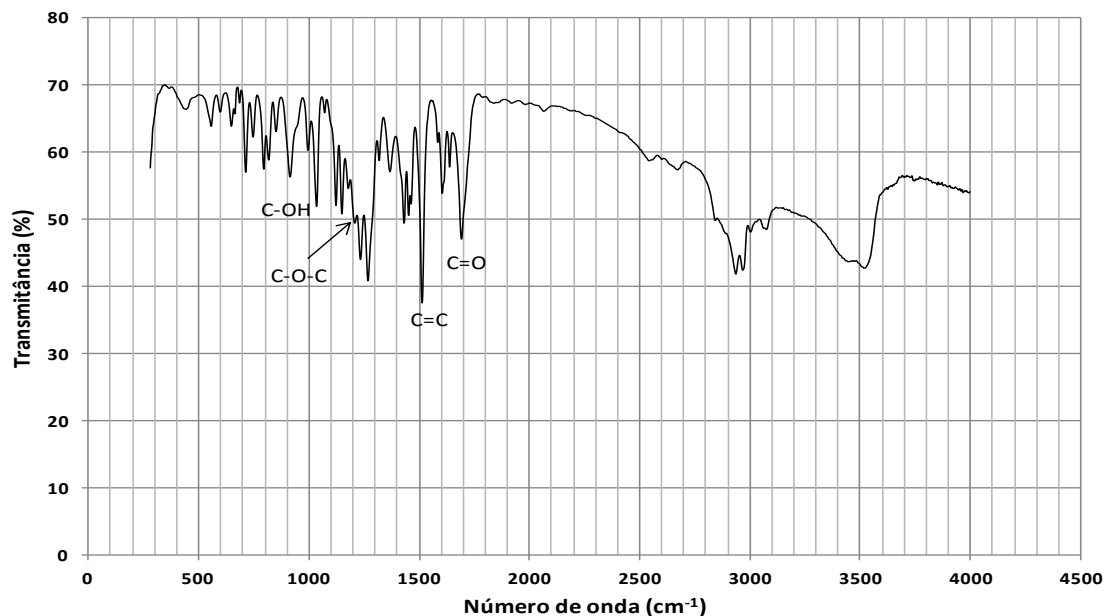


Figura 33-Espectro FTIR do branco da reação 3 de síntese eugenil benzoato (solução de ácido benzoico e eugenol em heptano).

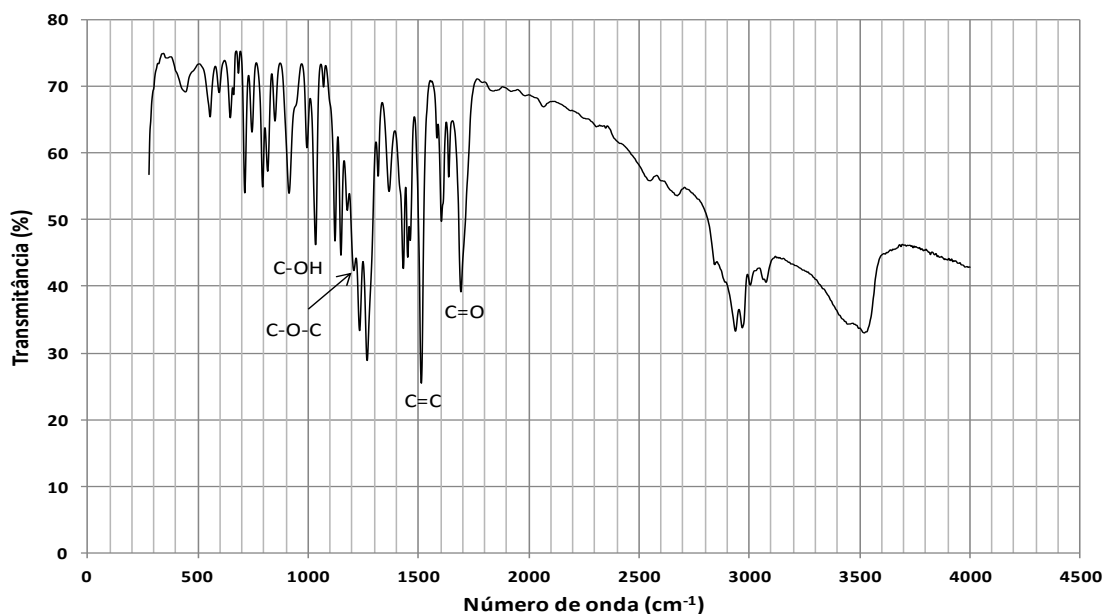


Figura 34-Espectro FTIR da reação 3 de síntese eugenil benzoato com enzima livre.

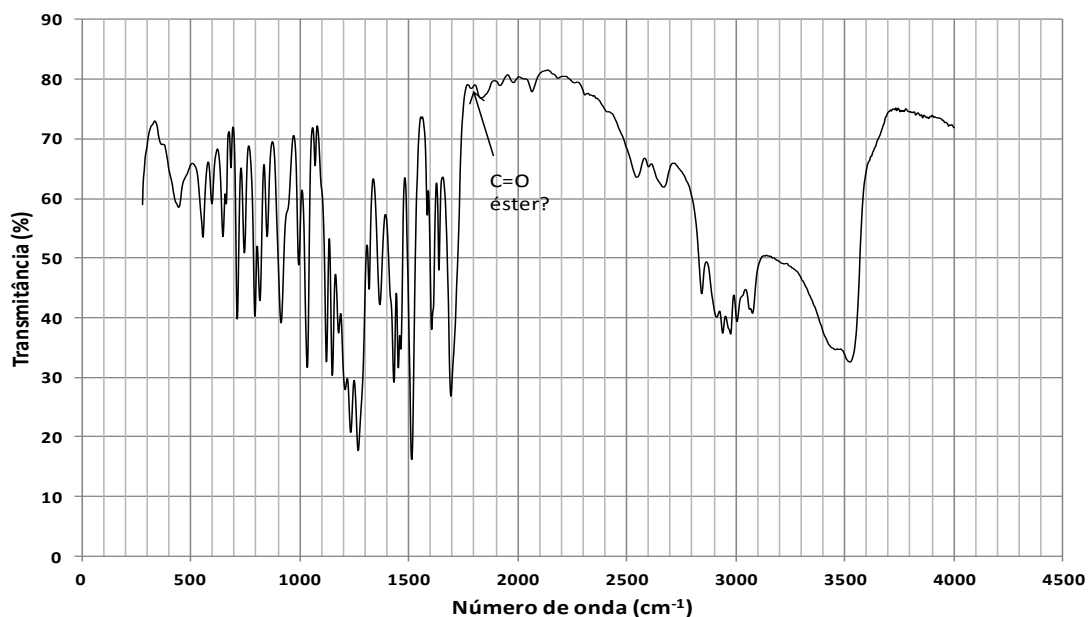


Figura 35-Espectro FTIR da reação 3 de síntese eugenil benzoato com enzima imobilizada.

Na Figura 35 surgiu aos 1785 cm^{-1} um pequeno pico, mas bem definido, que poderá representar a presença vestigial de um éster. Como a solução enzimática possui sorbitol e glicerol, que ficaram também retidos na CB juntamente com a enzima, poderá ser um sorbitil benzoato ou gliceril benzoato, visto que o pico está relativamente distante de 1739 cm^{-1} do eugenil benzoato.

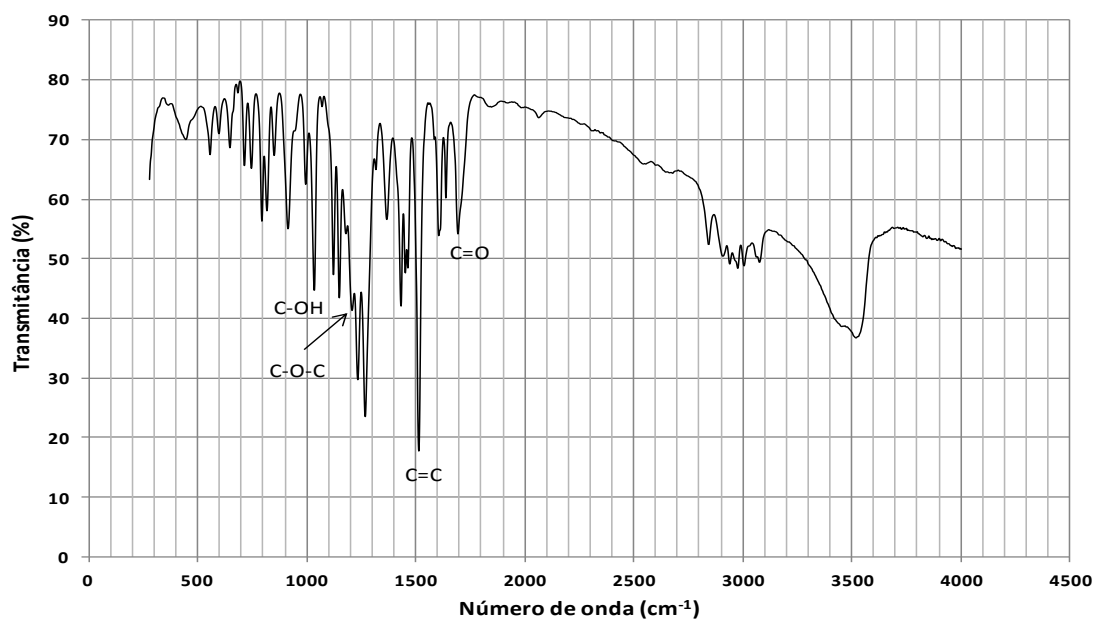


Figura 36-Espectro FTIR do branco da reação 4 de síntese eugenil benzoato (solução de ácido benzoico em eugenol).

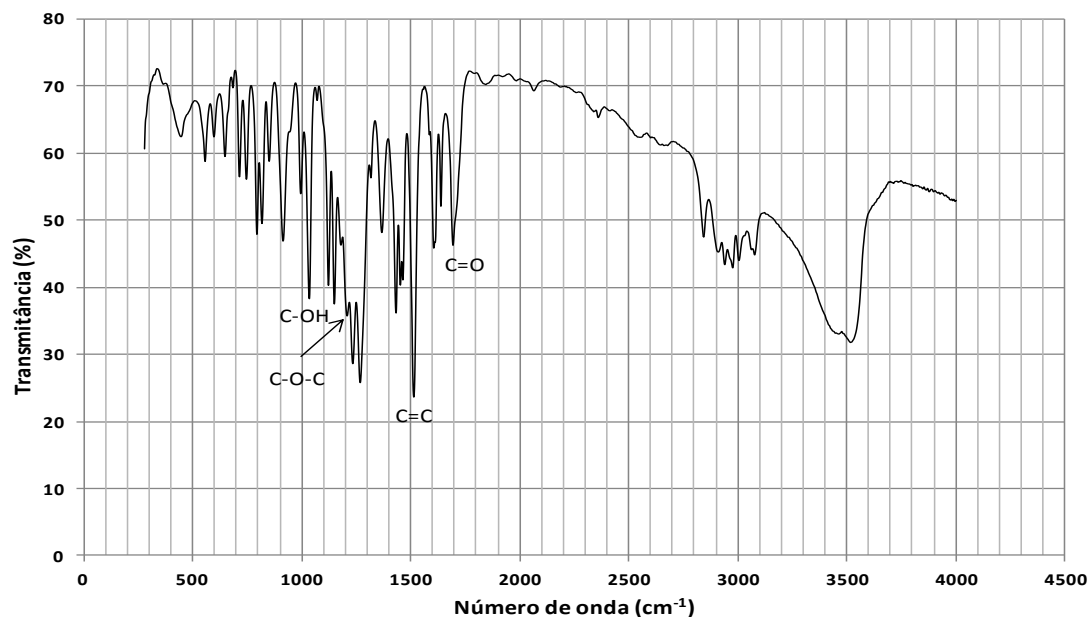


Figura 37-Espectro FTIR da reação 4 de síntese eugenil benzoato.

Os dois picos, que surgiram ao lado direito do pico de C-O-C do eugenol, são comuns nas moléculas de ácido benzoico e eugenol [46] e não foi possível determinar a sua origem.

De acordo com os resultados das análises aos meios reacionais, não foi conseguida a síntese do eugenil benzoato.

4.6.2. Propil galato

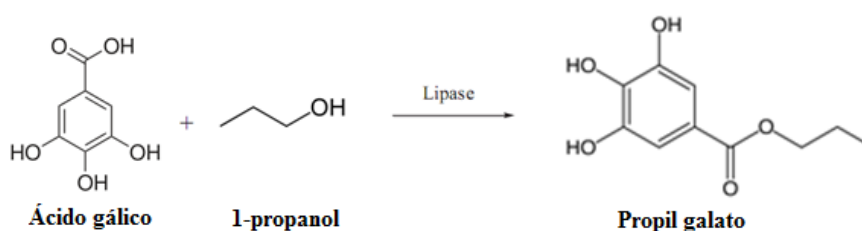


Figura 38-Síntese do propil galato.

Na síntese de propil galato foram testadas diferentes condições de operação em microrreator, apresentadas na Tabela 13. No final da reação os meios reacionais foram analisados por titulação e por FTIR. Os métodos de análise para verificar a síntese desta molécula basearam-se em Bouaziz et al. (2010) [33].

Tabela 13- Condições testadas na tentativa de síntese de propil galato.

Reações	Solvente	Ácido	Álcool	Temperatura
Propil galato (ácido gálico + propanol)				
1*	10mL propanol	0,83mmol	134mmol	50°C
2*	5ml heptano	0,7mmol	67mmol	50°C

Nota*- estas condições foram realizadas também com enzima livre, 400LU da solução comercial.

As titulações realizadas para os brancos, reações com enzima livre e imobilizada necessitaram do mesmo volume de hidróxido de sódio para se obter uma mudança de cor, mas não causada pela presença do indicador fenolftaleína (cor rosa) como referido em Bouaziz et al. (2010). Todas as titulações realizadas, em vez da cor rosa, apresentaram a cor verde quando se atingiu o equilíbrio molar entre ácido e base.

Para entender o aparecimento da cor verde, em vez do rosa, foram tituladas soluções padrão de ácido gálico e o propil galato em propanol com hidróxido de sódio, na presença e ausência do indicador fenolftaleína. As titulações do ácido gálico demonstraram que a presença de fenolftaleína é irrelevante, pois independentemente de estar ou não presente, assim que se atingiu o equilíbrio molar a cor que surgiu foi o verde (Anexo F: Figura 58). O aparecimento do verde anulou completamente o rosa que deveria surgir.

Nas titulações realizadas às soluções de propil galato, a presença e ausência de fenolftaleína apresentaram diferenças finais na cor, mas também foi demonstrado que a presença de um indicador é desnecessária. As titulações com fenolftaleína no momento de equilíbrio revelaram a cor rosa, na ausência de indicador revelaram cor amarela (âmbar/dourado). A presença da fenolftaleína anulou o aparecimento do amarelo. Desta forma foi possível perceber que tanto o ácido gálico como o propil galato são moléculas que se auto indicam numa titulação com base, logo é desnecessária a presença de indicador, o que não foi referido em Bouaziz et al. (2010), nem encontrado durante a revisão bibliográfica destas moléculas.

Para saber se a cor verde do ácido gálico também anulava o aparecimento da cor amarela característica na titulação do propil galato, foram preparadas três soluções com diferentes rácios molares (3:1, 1:1, 1:3) de ácido gálico/ propil galato em propanol. Todas as soluções atingiram o equilíbrio molar no volume de solução hidróxido de sódio calculado. As titulações em que a quantidade molar de ácido gálico foi igual ou superior à de propil galato (3:1, 1:1) revelaram cor verde no final. A titulação com a quantidade

molar de propil galato superior (1:3) revelou, no final, cor amarela. Desta forma, foi possível concluir que através de uma titulação será possível saber se existiu esterificação do ácido gálico com propanol, se o rendimento da reação for igual ou superior a 75%. Caso o rendimento seja igual ou inferior a 50%, nada se poderá concluir em relação à formação de propil galato, pois surgirá a cor verde do ácido gálico.

Ficou claro que determinar o consumo de ácido gálico por titulação com hidróxido de sódio e fenolftaleína a indicador, como é referido em Bouaziz et al. (2010) não é possível, pois além do indicador ser inútil, o éster propil galato comporta-se também como um ácido na titulação. O volume de hidróxido de sódio utilizado será sempre o mesmo, independentemente da formação ou não do éster. A única diferença que poderá ser observada é a cor final.

Para perceber se ácido gálico e propil galato são indicadores de pH de cor reversível (ex: nitrofenol, fenolftaleína, azul bromotimol), no final de cada titulação foram adicionadas gotas de ácido clorídrico concentrado. No caso do ácido gálico, a cor verde formada foi irreversível, pois adicionar excesso de ácido só diluiu a cor. Na solução de propil galato, adicionando ácido, a cor amarela desapareceu e a solução voltou a incolor. Adicionando excesso de base, a solução de propil galato passou de amarelo a laranja (Anexo F: Figura 59), mas também reversível com adição de ácido.

Os indicadores mais utilizados que alteram a cor de acordo com o pH (ex: fenolftaleína, azul bromotimol, *p*-nitrofenol), têm na sua estrutura anéis aromáticos e grupos hidroxilo ionizáveis. A teoria iónica dos indicadores, atribuída a W. Ostwald (1894), baseada na teoria da dissociação eletrolítica iónica dos indicadores, diz que os indicadores são bases ou ácidos fracos, cuja cor das moléculas não dissociadas difere da cor dos respetivos iões [47]. Os iões formados são, normalmente, os responsáveis pela presença de cor. O ião do *p*-nitrofenol de cor amarela, em meio básico, apresentado na secção 4.2.1 é um exemplo disso. O ácido gálico assim como o propil galato também são moléculas que apresentam na sua estrutura um anel aromático e grupos OH, que podem perder o hidrogénio originando iões em meio básico. No caso do ácido gálico que origina a cor verde, provavelmente não será um ião, mas a formação de uma molécula nova, uma vez que a reação que promoveu a cor é irreversível. No caso do propil galato o aparecimento das cores amarelo e laranja, poderá ser justificada pela teoria iónica dos indicadores [47]. A teoria iónica dos indicadores não oferece explicações para o

mecanismo pelo qual as diferentes cores surgem ou desaparecem, mas a teoria cromófora sugere que a coloração das substâncias deve-se à presença de certos grupos de átomos ou ligações duplas nas moléculas, criando grupos cromóforos devido a arranjos de vários grupos carbonilos (C=O), ou ligações duplas próximas [47].

Tal como no eugenil benzoato, também para o propil galato foram realizadas análises por FTIR. Nas Figuras 39 e 40 foram representados os espectros do padrão propil galato pelos dois métodos FTIR-ATR e FTIR. Como foi possível verificar têm picos idênticos. As diferenças observadas devem-se à diferença de concentração do padrão, que na Figura 40 foi diluído em propanol.

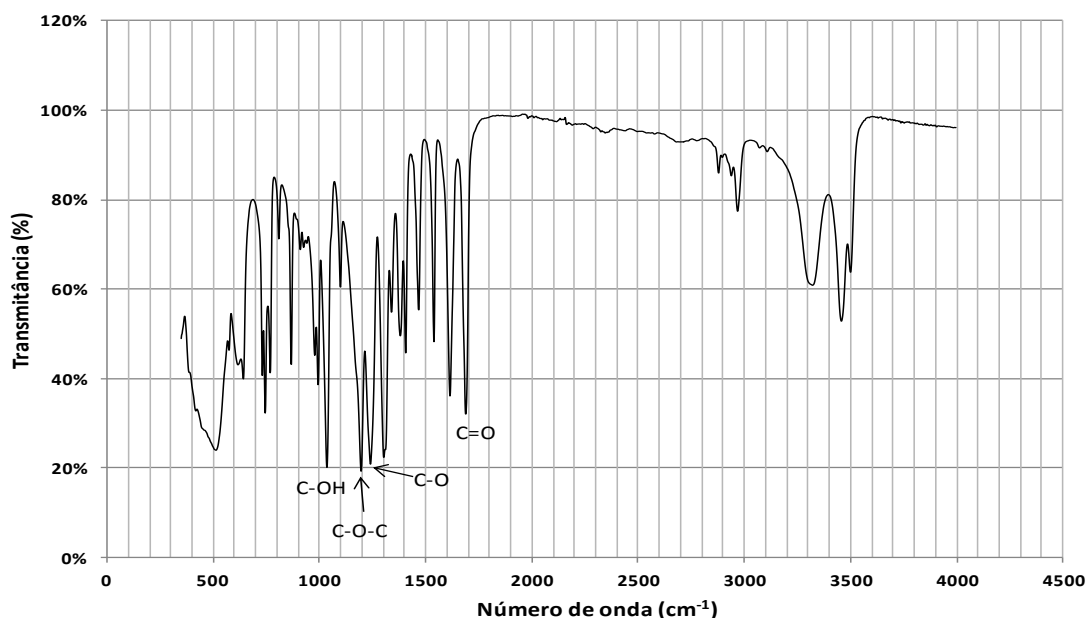


Figura 39-Espectro do padrão propil galato obtido por FTIR-ATR.

Os espectros do padrão propil galato são um pouco diferentes dos espectros comuns de um éster. Nos 1691cm^{-1} surgiu o pico da ligação do grupo carbonilo (C=O) do éster que é igual ao grupo carboxílico (C=O) do ácido gálico [48]. Os picos 1612 , 1535 e 1469cm^{-1} são picos que surgiram e são característicos do propil galato, mas também do ácido gálico devido ao anel aromático [48]. Aos 1200cm^{-1} e 1248cm^{-1} surgiram dois picos, sendo o primeiro representante das vibrações de alongamento da ligação C-O-C típicas do éster e o segundo das ligações C-O, tal como no eugenil benzoato.

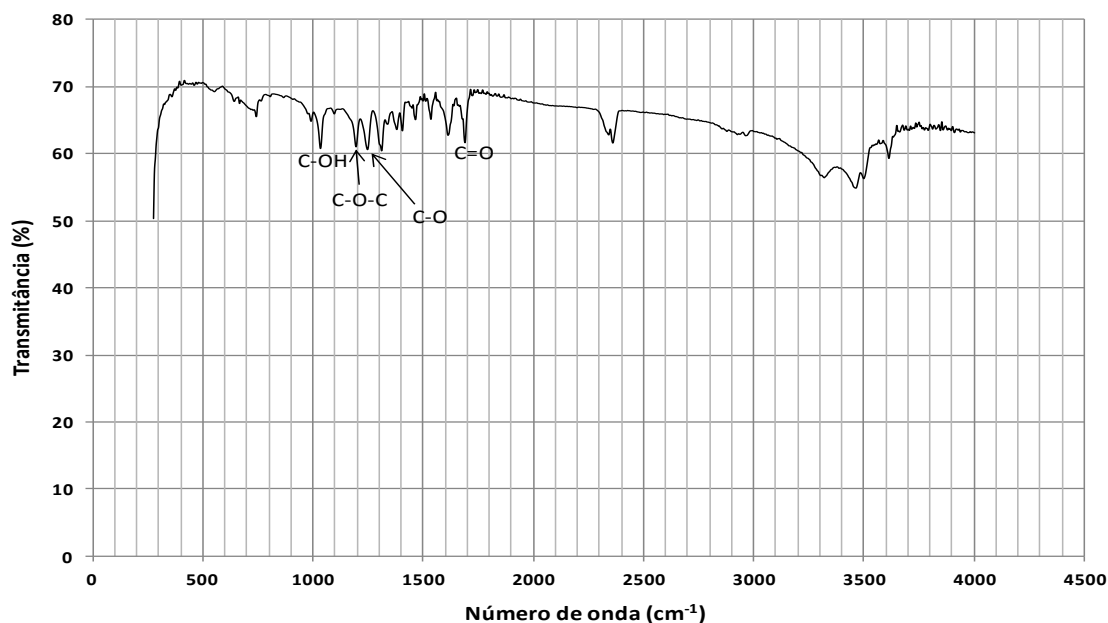


Figura 40-Espectro do padrão propil galato obtido por FTIR.

Isto foi comprovado com base na Figura 42 retirada da publicação de Beena et al. (2011), onde foi realizada a síntese de propil galato por transesterificação direta de ácido tânico em meio de propanol, com a enzima tanase [49]. Foi possível observar na Figura 44 que o pico das ligações C-O-C surge aos 1200 cm^{-1} para o propil galato sintetizado por via enzimática. O padrão propil galato de Beena et al. (2011) é igual ao já apresentado na Figura 39. O facto de no espectro FTIR do propil galato sintetizado pelos autores aparecer um pico único e mais largo, pode estar relacionado com algum reagente usado que tenha disfarçado a presença do pico 1248 cm^{-1} . A presença dos dois picos foi, claramente, distinguida nos padrões devido à elevada pureza dos mesmos.

O pico 1248 cm^{-1} também surge no ácido gálico (gama $1230\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) [48,50] e o seu aparecimento parece estar relacionado com os grupos -OH do anel aromático [48]. O pico aos 1033 cm^{-1} está relacionado com as ligações C-OH existentes no anel aromático, que são comuns no ácido gálico e no propil galato. A única diferença nos espectros FTIR das duas moléculas foi o pico 1200 cm^{-1} , que apenas surge no propil galato devido à ligação C-O-C típica dos ésteres.

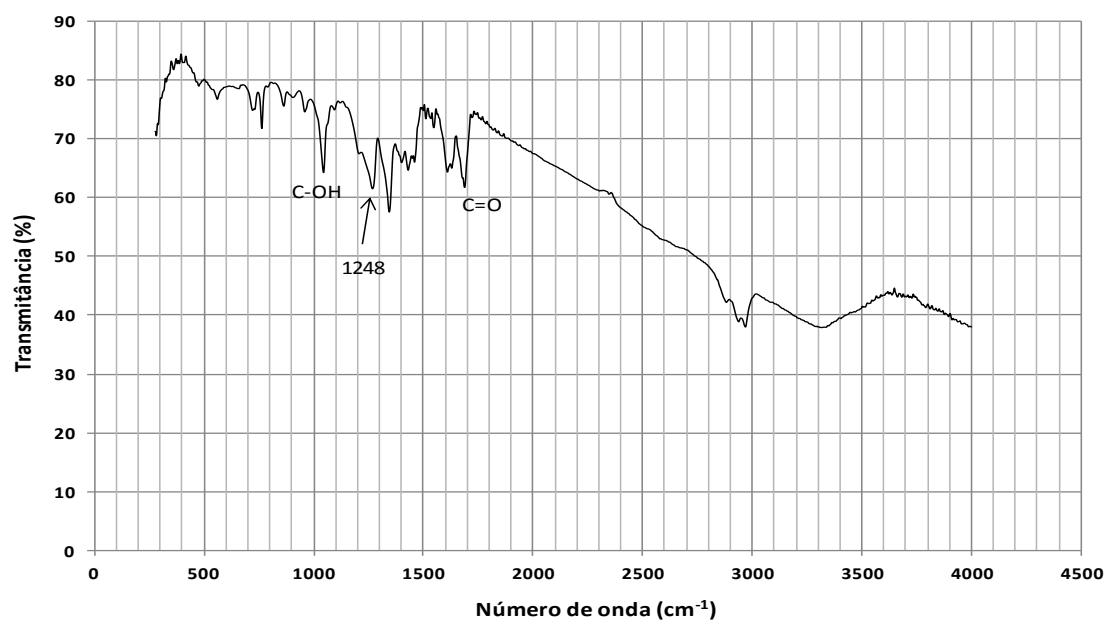


Figura 41-Espectro FTIR do branco da reação 2 de síntese propil galato (solução de ácido gálico em heptano/propanol).

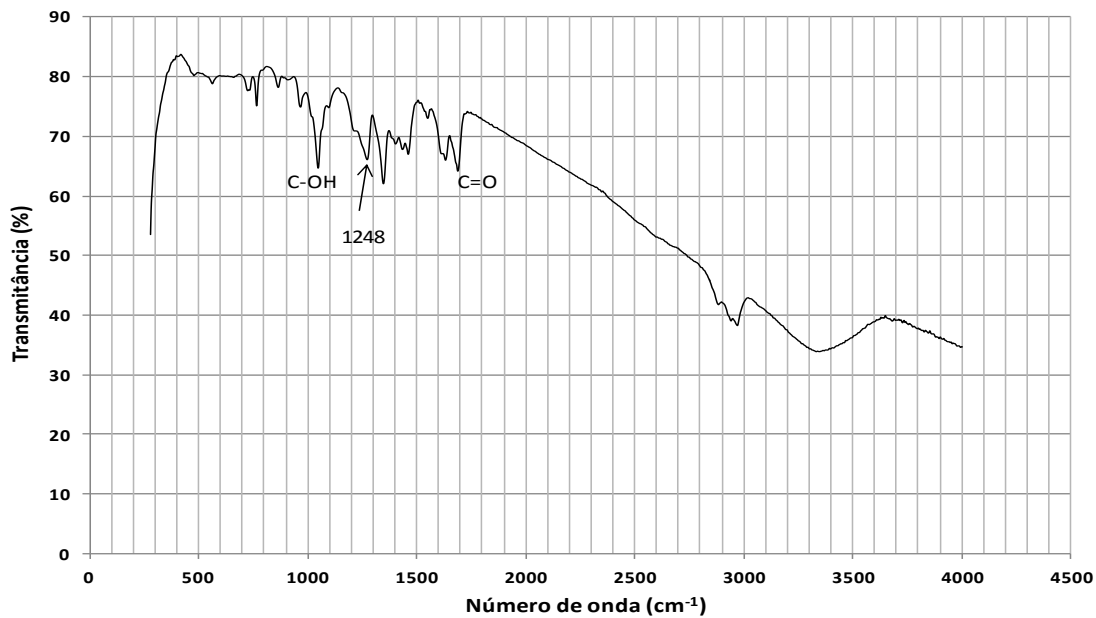


Figura 42- Espectro FTIR da reação 2 de síntese propil galato com enzima livre.

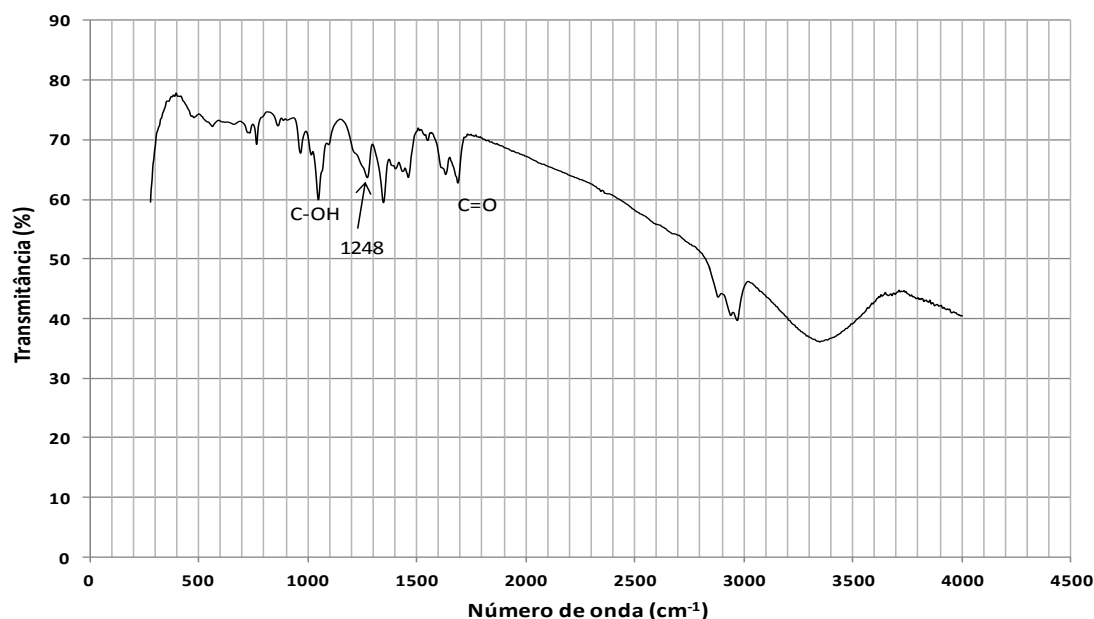


Figura 43- Espectro FTIR da reação 2 de síntese propil galato com enzima imobilizada.

Na Figura 41 foi possível verificar, precisamente, a ausência do pico na zona dos 1200cm^{-1} e apenas a presença do 1248cm^{-1} o que era esperado, pois trata-se do espectro de uma solução de ácido gálico (Branco). Nos espectros das reações (Figura 42 e Figura 43) não surgiu o pico correspondente à ligação C-O-C do propil galato, confirmando a ausência de esterificação como as titulações que revelaram cor verde.

Na Figura 45 está representado o espectro FTIR do propil galato sintetizado por Bouaziz et al. (2010). O espectro não corresponde ao apresentado nas Figuras 39 e 40, nem ao apresentado em Beena et al. (2011) para a mesma molécula. O grupo carbonilo aos 1750cm^{-1} é o esperado para qualquer outro éster, mas não no propil galato como já foi visto. Também é de notar a ausência de todos os outros picos característicos do propil galato. O espectro FTIR apresentado por Bouaziz et al. (2010) não pode ser do propil galato como foi descrito na publicação [33].

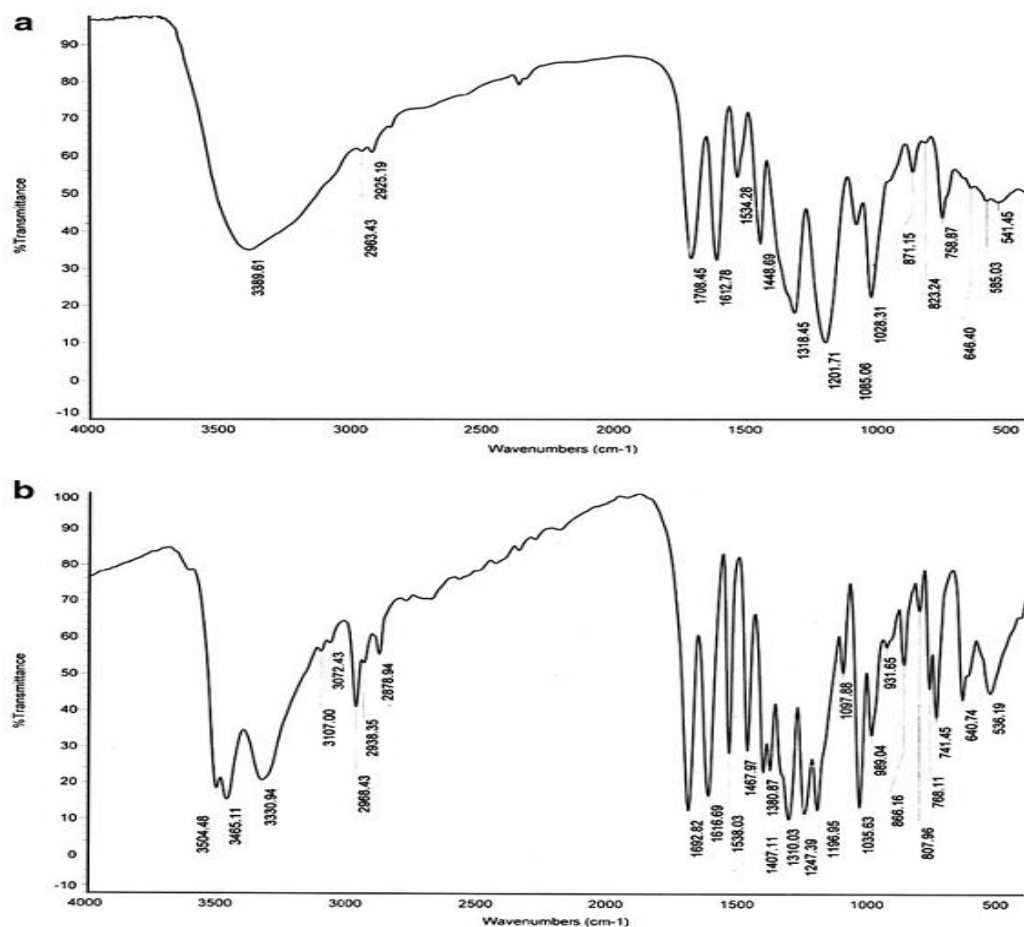


Figura 44-Espectros FTIR de propil galato sintetizado (a) e padrão de propil galato (b) [49].

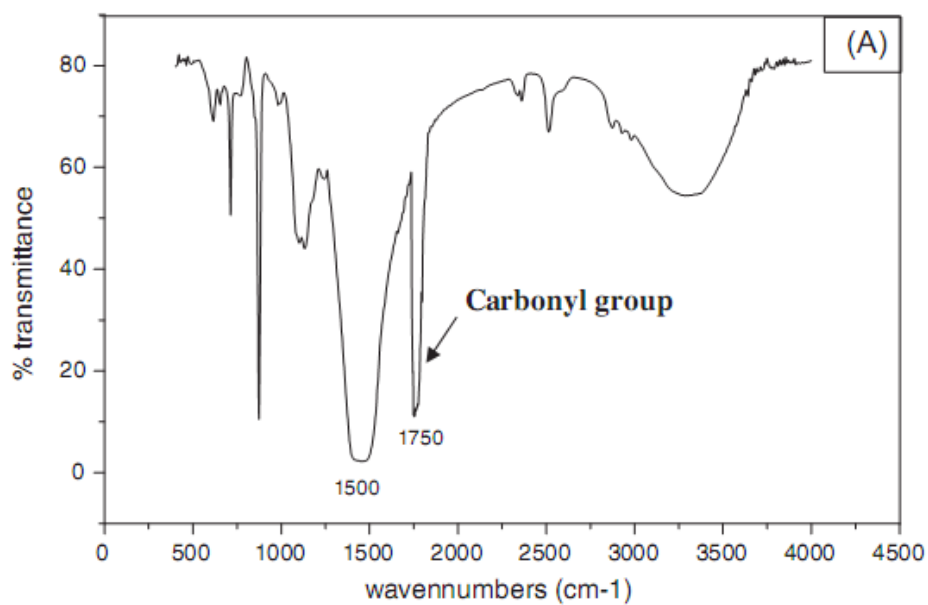


Figura 45-Espectro FTIR de propil galato sintetizado [33].

4.6.3. Atividade dos suportes enzimáticos após meio não convencional

Perante o insucesso na síntese dos ésteres, foram testadas as atividades dos suportes enzimáticos na hidrólise *p*-nitrofenil acetato para verificar se existia CALB ativa. Os suportes testados corresponderam aos utilizados na reação 2 da tentativa de síntese do propil galato e nas reações 3 e 4 da tentativa de síntese do eugenil benzoato.

Tabela 14-Atividade das imobilizações (UI) após meio não convencional e n° de vezes que superou a velocidade da reação não catalisada.

Imobilizações	Atividade (UI) no microrreator	Reação não catalisada
Reação 2 (propil galato)	81,84	23,72x
Reação 3 (eugenil benzoato)	78,75	22,86x
Reação 4 (eugenil benzoato)	32,04	9,29x

O suporte enzimático utilizado na tentativa de síntese do propil galato revelou uma atividade de 81,84 UI, o da reação 3 do eugenil benzoato teve 78,75 UI e o da reação 4 apresentou 32,04 UI. Isto corresponde à atividade observada após 7 a 8 ciclos em meio convencional para os suportes com atividade superior. Para o suporte da reação 4 corresponde à utilização de cerca de 15 ciclos no meio convencional.

O suporte que esteve no meio em que o solvente era exclusivamente eugenol foi o que apresentou menor atividade, isto pode ser justificado pelo aspeto físico dos pedaços de CB no final das 16h de reação. Os pedaços de CB apresentaram um volume muito inferior ao apresentado pelos outros dois suportes, como se tivessem sido esmagados durante a reação. O volume inicial nunca foi recuperado nem com a reidratação durante a lavagem. A redução do volume pode ter contribuído para a perda extra de enzima. Os outros dois suportes apresentaram atividades muito próximas e não foram observadas alterações físicas. Os meios com heptano foram mais favoráveis para manter a integridade física dos suportes de CB, isto pode dever-se à diferença de densidade dos solventes. O eugenol tem uma densidade superior ao heptano e ao propanol, sendo que também parece mais viscoso, o que pode ter sido a causa da compressão da CB.

É de realçar, que apesar de terem sido sujeitas a 8h no exsiccador, 16h de reação em meio não convencional, 10min de lavagem em etanol/tampão e cerca de 2 meses preservadas no congelador, até ao teste de atividade, as imobilizações em CB permitiram

atingir uma velocidade de hidrólise de *p*-nitrofenil acetato cerca de 23 vezes superior à reação não catalisada. No caso do suporte que revelou menor atividade, ainda permitiu atingir uma velocidade de reação cerca de 9 vezes superior à não catalisada.

Desta forma, é possível garantir que não foi por falta de enzima, nem por inativação enzimática no meio não convencional que as esterificações falharam. No entanto pode ter existido inibição da CALB ou presença de água que não permitiu a reação, o que parece pouco provável, pois os reagentes estiveram guardados no exsiccador e os solventes eram puros. A causa mais provável é ter existido inibição da CALB por parte dos ácidos e até do eugenol, mas seria necessário realizar testes para confirmar. No entanto, como foi revisto na pesquisa bibliográfica o ácido gálico, ácido benzoico e eugenol são conservantes e antissépticos poderosos, logo inibem e combatem grande parte da atividade biológica. Já foi sintetizado eugenol acetato com grande sucesso usando a CALB (*Novozym*[®] 435) como demonstrou Chiaradia et al. (2012) [29], logo o eugenol não inibe significativamente a enzima. O problema pode estar na estabilidade e proteção que a imobilização comercial em resina acrílica oferece à enzima e que a CB pode não oferecer. Será necessário mais trabalho laboratorial e estudo das condições operacionais, para ser possível sintetizar os ésteres propostos nesta tese com CALB imobilizada em CB.

5. Conclusão e sugestões de trabalho futuro

Os dois métodos de imobilização testados não apresentaram diferenças muito significativas no final dos ciclos. Durante os primeiros ciclos as adsorções foram melhores a resistir à perda de atividade, mas no decorrer de mais utilizações as imobilizações por ligação covalente deram indícios de serem melhores. No entanto, o tipo de armazenamento influenciou bastante a performance das imobilizações. Tendo em conta os resultados obtidos é importante conservar as imobilizações sempre num local com temperaturas negativas como os congeladores, a fim de manter a estabilidade e conservação da CALB. Como os resultados mostraram, as imobilizações podem manter a sua atividade por mais de 100 dias de armazenamento no congelador sem perderem qualidade.

É de especial importância referir que apesar de terem mantido apenas 12 a 13% de atividade residual no final dos 15 ciclos, isto correspondeu a uma velocidade de reação catalisada dez vezes superior à velocidade da reação natural, mesmo após 14 ciclos de utilização e 28 lavagens dos suportes.

Algo que ficou claro é o facto de ser necessário otimizar o processo de oxidação da CB, o protocolo aplicado revelou ser demasiado forte, como se pode ver nas imagens obtidas por SEM, causando muitos danos na estrutura da CB. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos com oxidações ótimas, não parece ser vantajoso oxidar a celulose utilizando peróxido de sódio para estabelecer ligações covalentes. Tendo em conta os resultados apresentados em algumas publicações a utilização de agentes de co-imobilização como os tensioativos (Ex: *Tween 80* e *PEG 6000*) ou a utilização do fixador gluteraldeído permitem garantir uma estabilidade operacional muito superior às imobilizações enzimáticas. Os tensioativos permitem uma maior dispersão e estabilidade das enzimas no suporte evitando problemas de agregação, como parece ter acontecido com a CALB na CB.

A síntese dos ésteres eugenil benzoato e propil galato não foi conseguida, mas ficaram apontadas formas simples e relativamente rápidas de detetar a sua presença em solução e perceber se existiu ou não reação, dispensando para este fim a utilização dos métodos mais complicados e morosos como o GC-MS e HPLC, que deverão ser usados como métodos de quantificação em caso de sucesso das esterificações. Neste documento foi publicado um espectro FTIR do éster eugenil benzoato. O espectro FTIR desta molécula não foi encontrado durante a pesquisa bibliográfica.

Na síntese de ésteres poderá ser vantajoso adicionar ao microrreator agentes desumidificantes (Ex: esferas sílica gel) para recolherem a água que é formada durante a reação, algo que não foi usado no decorrer das tentativas. Na síntese de eugenil benzoato, em vez do ácido benzoico, poderá ser mais vantajoso usar o haleto de cloro deste ácido como reagente (cloreto de benzoila), uma vez que a atividade das lipases é potenciada pela presença de cloro.

Todo o trabalho foi desenvolvido com volumes reacionais pequenos, o que prova que é possível desenvolver, otimizar ou testar processos usando quantidades reduzidas de materiais e reagentes em microrreatores.

6. Bibliografia

- [1] Moo-Young, M., Butler, M., Webb, C., Moreira, A., Grodzinski, B., Cui, Z.F., Agathos, S. *Comprehensive Biotechnology, 2nd edition, Elsevier*. 2011.
- [2] Huang, X.J., Chen, P.C., Huang, F., Ou, Y., Chen, M.R., Xu, Z.K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011. 70: 95-100.
- [3] Khan, A., Alzohairy, M. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Research Journal of Biological Sciences* 5. 2010. 8: 565-575.
- [4] Carvalho, W., Canilha, L., Silva, S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*. 2006. 23: 60-70.
- [5] Ratledge, C., Kristiansen, B. *Basic Biotechnology, 2nd edition, Cambridge*. 2001.
- [6] Itabaiiana, I. Jr., Miranda, L., Souza, R. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85. 2012. 86: 1-9.
- [7] Committee, MEDEA+Scientific. *Bio-Chips and Chips for Bio*. 2003. [Online] [Citado: 11/8/2013] http://www.imec-nl.nl/content/user/File/Biochips_FinalReport_1_.pdf
- [8] Baldo, V., Paiva, A., Malcata, F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996. 18: 392-416.
- [9] Chen, P.C., Huang, X.J., Huang, F., Ou, Y., Chen, M.R., Xu, Z.K. Immobilization of lipase onto cellulose ultrafine fiber membrane for oil hydrolysis in high performance bioreactor. *Cellulose*. 2011. 18: 1563-1571.
- [10] Durand, E., Lecomte, J., Baréa B., Piombo, G., Dubreucq, E., Villeneuve, P. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry*. 2012. 47: 2081-2089.
- [11] Aires-Barros, M. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia*. 2002. 72: 2-12
- [12] Nagarajan, S. New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. 168:1163-1196.
- [13] Reetz, M. Lipases as practical biocatalysts. *Biocatalysis and biotransformation*. 2002. 6: 145-150.
- [14] Jaeger, K., Reetz, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*. 1998. 16: 396-403.
- [15] Kirk, O., Christensen, M. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development*. 2002. 6: 446-451.

- [16] Horchani, H., Aissa, I., Ouertani, S., Zarai, Z., Gargouri, Y., Sayari, A. *Staphylococcal* lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011. 76: 125-132.
- [17] Anderson, E., Larsson, K., Kirk, O. One biocatalyst-many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 1998. 16: 181-204.
- [18] Hayashi, H., Yanagishita, Y., Matsumura, S. Chemoenzymatic Synthesis and Chemical Recycling of Poly(ester-urethane)s. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011. 12: 5490-5507.
- [19] Yanagishita, Y., Kato, M., Toshima, K., Matsumura, S. Chemoenzymatic Synthesis and Chemical Recycling of Sustainable Polyurethanes. *ChemSusChem*. 2008. 1: 133-142.
- [20] Matsumura, S., Soeda, Y., Toshima, K. Perspectives for synthesis and production of polyurethanes and related polymers by enzymes directed toward green and sustainable chemistry. *Applied Microbiological Biotechnology*. 2006. 70: 12–20.
- [21] Turner, N., Vulfson, E. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. 27: 108–113.
- [22] Fu, L., Zhanga, J., Yang, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*. 2013. 92: 1432-1442.
- [23] Karimpil, J., Melo, J., D’Souza, S. Immobilization of lipase on cotton cloth using the layer-by-layer self-assembly technique. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012. 50: 300–302.
- [24] Wu, J.M., Liu, R.H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012. 115: 284-290.
- [25] Wu, S.C., Lia, Y.K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2007. 54: 103-108.
- [26] Yao, W., Wu, X., Zhuc, J., Sund, B., Miller, C. In vitro enzymatic conversion of -aminobutyric acid immobilization of glutamate decarboxylase with bacterial cellulose membrane (BCM) and non-linear model establishment. *Enzyme and Microbial Technology*. 2013. 52: 258–264.
- [27] Karra-Châabounia, M., Bouazizb, I., Boufib, S., Rego, A., Gargouri, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2008. 66: 168-177.
- [28] Horchani, H., Salem, N., Zarai, Z., Sayari, A., Gargouri, Y., Chaâbouni, M. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. *Bioresource Technology*. 2010. 101: 2809-2817.
- [29] Chiaradia, V., Paroul, N., Cansian, R., Júnior, C., Detofol, M., Lerin, L., Oliveira, J. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012.

- [30] Chaibakhsh, N., Basri, M., Anuar, S., Rahman, M., Rezayee, M. Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2012. 1: 226-231.
- [31] Sadeghian, H., Seyedi, S., Saberi, M., Arghiani, Z., Riazi, M. Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007. 16: 890-901.
- [32] Yadav, G., Yadav, A. Insight into esterification of eugenol to eugenol benzoate using a solid super acidic modified zirconia catalyst UDCaT-5. *Chemical Engineering Journal*. 2012. 192: 146–155.
- [33] Bouaziz, A., Horchani, H., Salem, N., Chaari, A., Chaâbouni, M., Gargouri, Y., Sayari, A. Enzymatic propyl gallate synthesis in solvent-free system: Optimization by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010. 67: 242-250.
- [34] Wang, J., Wu, H., Chen, Y., Zhai, M., Qing, X., Yu, R. Quantitative determination of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in cosmetics using three-dimensional fluorescence coupled with second-order calibration. *Talanta*. 2013. 116: 347–353.
- [35] Mascarello, A., Leal, P., Derita, M., Zuljan, F., Nunes, R., Zacchino, S., Yunes, R. Relação entre lipofilicidade de alquil galatos e atividade antifúngica contra *Microsporum gypseum*. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Sociedade Brasileira de Química.
- [36] Verna, M., Anzi, W., Kanwari, S. Enzymatic Synthesis of Isopropyl Acetate by Immobilized *Bacillus cereus* Lipase in Organic Medium. *Enzyme Research*. 2011. 2011, Article ID 919386, 7 pages.
- [37] Tan, T., Chen, B., Ye, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2005. 29: 41-45.
- [38] Novozymes. Lipzyme CalB L. *Industry submission*. 2004. LUNA N°.39073-01.
- [39] Carreira, P., Mendes, J., Trovatti, E., Serafim, L., Freire, C., Silvestre, A., Neto, C. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*. 2011. 102: 7354-7360.
- [40] Varma, A., Kulkarni, M. Oxidation of cellulose under controlled conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 2002. 77: 25–27.
- [41] Brígida, A., Pinheiro, A., Ferreira, A., Gonçalves, L. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008. 146: 173–187 .
- [42] Baptista, A., Borges, J., Ferreira, I. Produção de biomateriais a partir de membranas obtidas pela técnica de electrofiação. *Ciência & Tecnologia dos Materiais*. 2010. 22: nº1/2.
- [43] Wu, Y., He, J., Cheng, W., Gu, H., Guo, Z., Gao, S., Huang, Y. Oxidized regenerated cellulose-based hemostat with microscopically gradient structure. *Carbohydrate Polymers*. 2012. 88: 1023–1032.

- [44] Derya, Y., Imera, K., Dizgea, N., Koyuncua, I. Enzymatic activation of cellulose acetate membrane for reducing of protein fouling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012. 92: 334–339.
- [45] Institute of Chemistry, University of Tartu, Estónia. *Database of ATR-IR spectra of materials related to paints and coatings*. [Online] [Citado: 11/8/2013.] http://tera.chem.ut.ee/IR_spectra/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=60
- [46] National Institute of Standards and Technology, USA. Livro de Química do NIST na Web. [Online] [Citado: 11/11/2013.] <http://webbook.nist.gov/>
- [47] Universidade federal do Pará. Teoria dos indicadores. [Online] [Citado: 11/2/2013.] <http://www.ufpa.br/quimicanalitica/sindicador.htm>
- [48] Vijayalakshmi, R., Ravindhran, R. Comparative fingerprint and extraction yield of *Diospyrus ferrea* (willd.) Bakh. root with phenol compounds (gallic acid), as determined by uv-vis and ft-ir spectroscopy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. S1367-S1371.
- [49] Beena, P., Basheer, S., Bhat, S., Bahkali, A., Chandrasekaran, M. Propyl Gallate Synthesis Using Acidophilic Tannase and Simultaneous Production of Tannase and Gallic Acid by Marine *Aspergillus awamori* BTMFW032. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011. 164: 612–628.
- [50] Wang, W., Chena, Q., Jianga, C., Yanga, D., Liub, X., Xua, S. One-step synthesis of biocompatible gold nanoparticles using gallic acid in the presence of poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007. 301: 73–79.

7. Anexos

Anexo A- Ficha para preparação de soluções

Tampão fosfato de sódio (0,05M) pH=7,2

1- $\frac{1}{4}$ Solução fosfato de sódio monobásico (0,05M)

2- $\frac{3}{4}$ Solução fosfato de sódio dibásico (0,05M)

- Exemplo para balão volumétrico 200mL: solução 50mL de 1 mais 150mL de 2.

0,30g de fosfato de sódio monobásico em 50mL de água destilada.

1,07g de fosfato de sódio dibásico em 150mL de água destilada.

Misturar bem as duas.

Ou

0,30g de fosfato de sódio mono mais 1,07g de fosfato de sódio dibásico diretamente em 200mL de água destilada. Dissolver bem.

Nota: Com a formulação anterior a solução terá pH 7,3, será preciso ajustar o pH com algumas gotas de solução ácido clorídrico 1M.

Soluções enzimáticas de CALB $\approx 2\text{mg/mL}$ e $\approx 4\text{mg/mL}$

Solução comercial ($\approx 29,15\text{mg/mL}$) Anexo C

Exemplo: Balões volumétricos 20mL

- Solução $2\text{mg/mL} \rightarrow 1,44\text{mL}$ da solução comercial, perfazer **20mL** com tampão fosfato.
- Solução $4\text{mg/mL} \rightarrow 2,88\text{mL}$ da solução comercial, perfazer **20mL** com tampão fosfato.

Periodato de sódio 0.02M em água destilada

Exemplo: para 100mL de solução

- **0,43g de NaIO_4 em 100mL de água destilada.**

Solução NaCl 0,85% em água destilada

Exemplo: para balões volumétricos de 200mL

- Dissolver **1,7g de NaCl** em **200mL** de **água destilada**.

Reta de calibração de proteína (solução mãe 100mg/mL)

- Branco, 150µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 750µg/mL, 1000µg/mL

Exemplo: **Balões volumétricos de 10mL** (volumes pipetados de solução mãe respectivos)

Branco (solução NaCl); 15µL; 25µL; 50 µL; 75µL; 100µL de solução mãe em cada balão respectivo e perfazer o volume com solução NaCl.

Nota: este é o procedimento oficial que acompanha o kit de quantificação de proteína, deve ser realizado para comparação, mesmo que não se use o NaCl como solvente da proteína.

Solução etanol/tampão fosfato (1:1 v/v) pH 7,2

Exemplo: 100mL de solução

Adicionar **50mL de etanol** com **50mL de solução tampão fosfato de sódio (0,05M)**.

Acertar o pH até 7,2 com solução de ácido clorídrico 1M.

Reta de calibração do *p*-Nitrofenol (solução mãe 10mM)

- (branco; 0,01mM; 0,05mM; 0,1mM; 0,15mM; 0,2mM; 0,25mM; 0,3mM; 0,35mM; 0,4mM; 0,45mM; 0,5mM)

Exemplo: **Balões volumétricos de 10mL** (volumes pipetados de solução mãe respectivos)

Branco, 10µL, 50µL, 100µL, 150µL, 200µL, 250µL, 300µL, 350µL, 400µL, 450µL, 500µL e perfazer os 10mL com a solução etanol/tampão fosfato 1:1 (vol/vol) pH 7,2.

Solução substrato *p*-Nitrofenil acetato (4mM)

Exemplo: **Balões volumétricos de 50mL**

0,03623g de *p*-nitrofenil acetato em 50mL de solução etanol/tampão fosfato 1:1 (vol/vol) pH 7,2

Anexo B- Cálculo da atividade (UI) no microrreator

No cálculo da atividade enzimática em cada ciclo foi usada a reta de calibração do *p*-nitrofenol (Figura 46) para determinar a concentração (em mmol/mL) referente a cada absorvência (2ª coluna Figura 47). Essa mesma concentração foi multiplicada por 10^3 para a concentração vir em $\mu\text{mol/mL}$ (3ª coluna Figura 45).

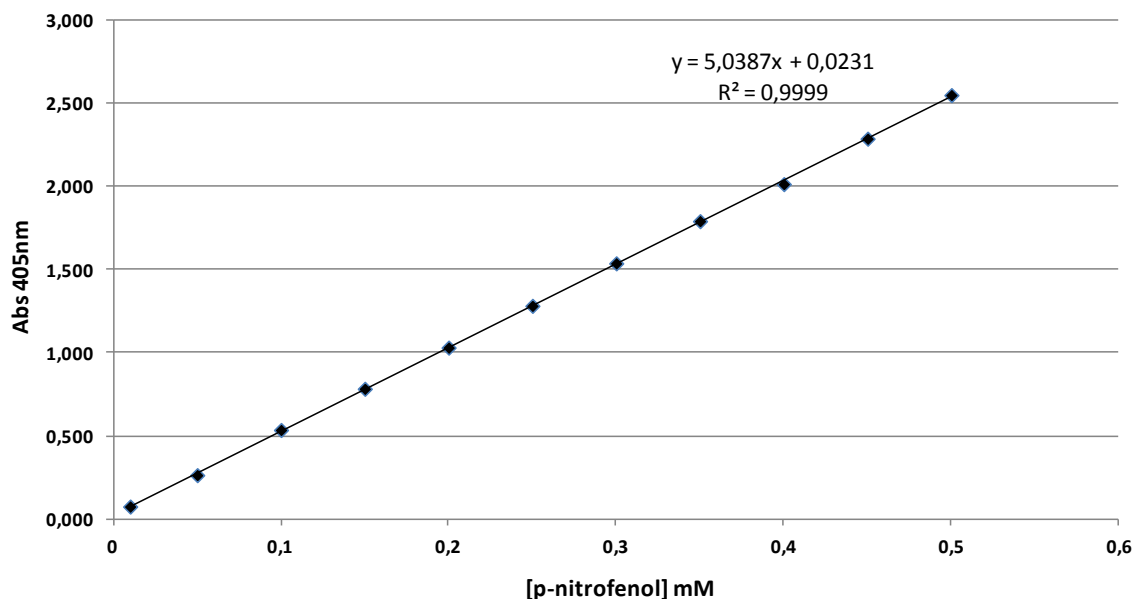


Figura 46- Reta calibração do *p*-nitrofenol pH (7,2)

No segundo passo foram escolhidos os melhores pontos para fazer a linearização da concentração de *p*-nitrofenol em função do tempo (s). Esta linearização é feita com os melhores pontos e para o melhor R^2 . O declive da reta foi usado na determinação da atividade (Figura 47). Para obter atividade por minuto, o declive da reta obtida (Ex: 0,2739 Figura 47) foi multiplicado por 60.

$$UI/mL (\mu\text{mol/mL/min}) = (\text{declive da reta}) \times 60$$

Para obter a atividade em UI no microrreator foi multiplicado o valor obtido anteriormente pelo volume total do microrreator (5mL).

$$A(\text{UI no microrreator}) = A(\mu\text{mol/mL/min}) \times V_{\text{total}}$$

No exemplo em questão este valor foi 82,17 UI (Figura 47)

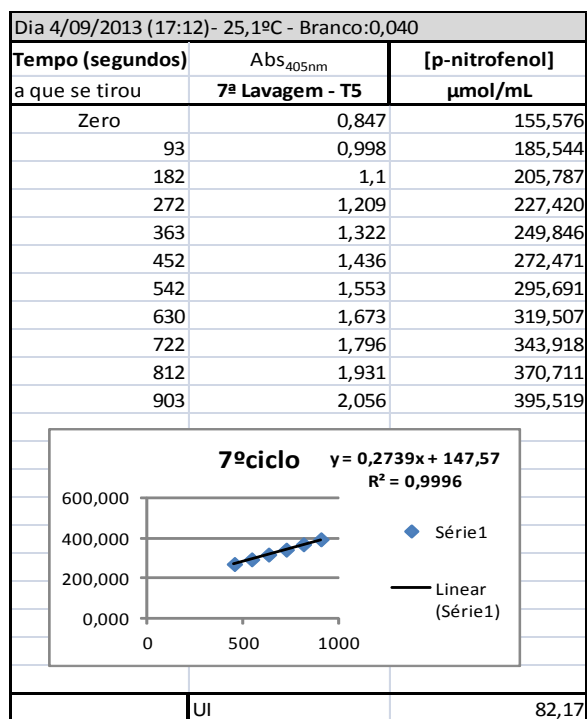


Figura 47- Representação das amostras do meio reacional ao longo de um ciclo, absorvência e concentração respectivas.

Anexo C- Quantificação da proteína na solução comercial de CALB

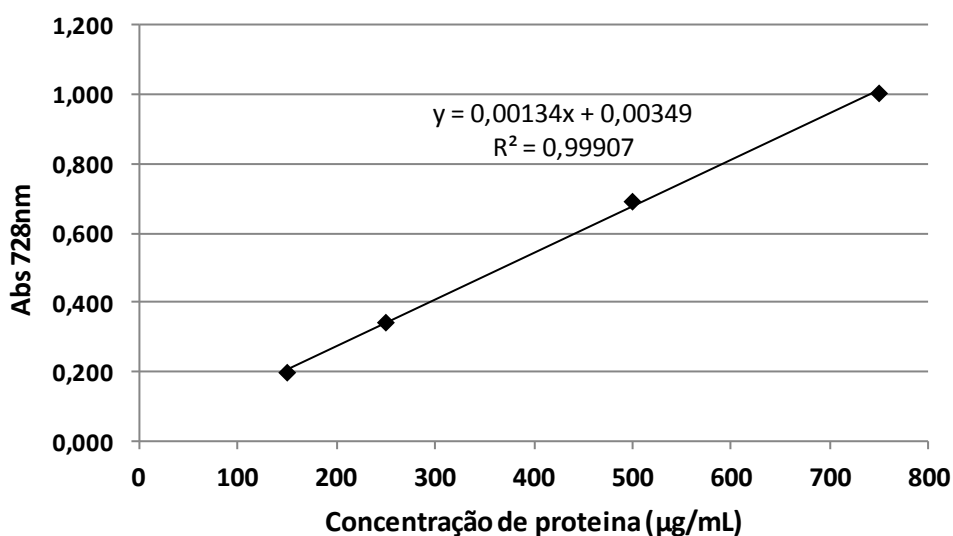


Figura 48-Reta calibração de proteína.

Tabela 15- Concentração de proteína na solução comercial de CALB.

	Abs _{728nm}	[Proteína] diluída (µg/mL)	Diluição	[Proteína] (µg/mL)	[Proteína] (mg/mL)	Média (mg/mL)	Desvio padrão
Volumes do kit proteína Sol. velha	0,388	295,77	100x	29576,92	29,58	29,15	1,14
1/2 dos Volumes do kit proteína Sol. velha	0,386	294,23		29423,08	29,42		
Sol. nova (1)	0,361	275,00		27500,00	27,50		
Sol. nova (2)	0,395	301,15		30115,38	30,12		

Houve necessidade de diluir a solução comercial para que a quantidade de proteína estivesse no intervalo de detecção do método. O valor de absorvência obtido no espectrofotômetro UV foi substituído na reta de calibração (Figura 48). O valor de concentração obtido foi multiplicado pelo fator de diluição e encontrada a concentração real da solução comercial de CALB.

Anexo D- Reta calibração do eugenol

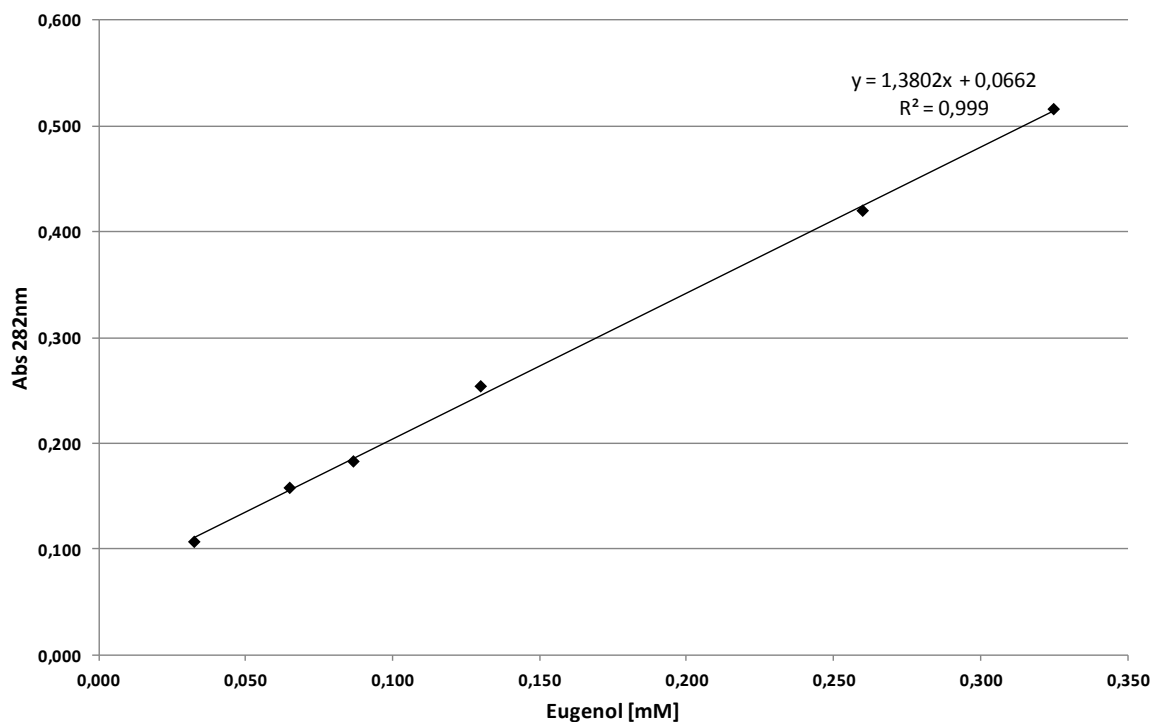


Figura 49-Reta calibração do eugenol

No trabalho também foi tentado quantificar o rendimento das reações de esterificação de eugenil benzoato pelo consumo de eugenol. Sabendo que este tem um pico máximo de absorvência UV a 282nm foi criada a reta de calibração (Figura 49). Esta via não será a mais indicada, pois o eugenol é bastante volátil e os padrões criados passadas umas horas apresentavam valores muito mais baixos de absorvência.

Anexo E- Espectros FTIR complementares

Na Figura 50 está representado o espectro FTIR do *p*-nitrofenil acetato com todos os picos mais relevantes assinalados. Aos 1750cm^{-1} surgiu o pico da ligação C=O e aos 1200cm^{-1} a ligação C-O-C, típicos dos ésteres.

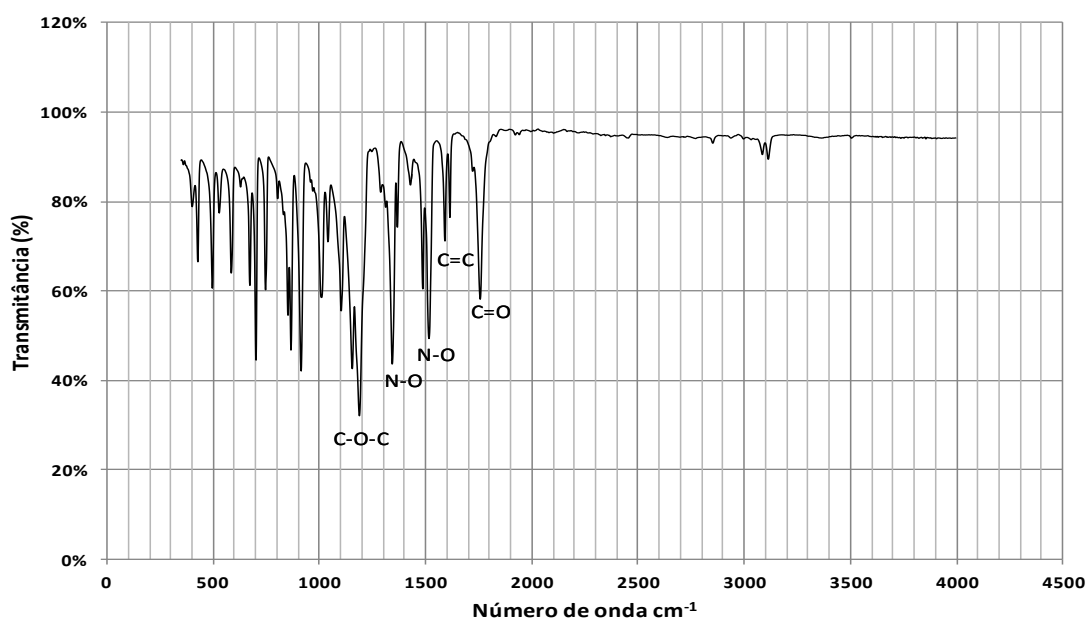


Figura 50-Espectro FTIR-ATR no *p*-nitrofenil acetato, com picos assinalados.

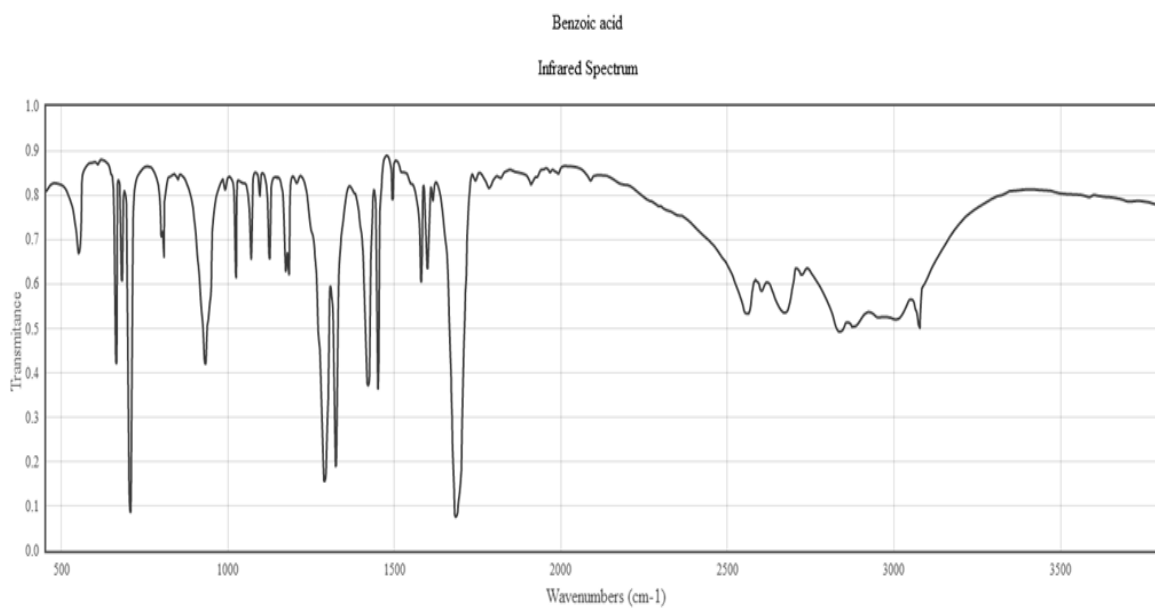


Figura 51-Espectro FTIR do ácido benzoico [46].

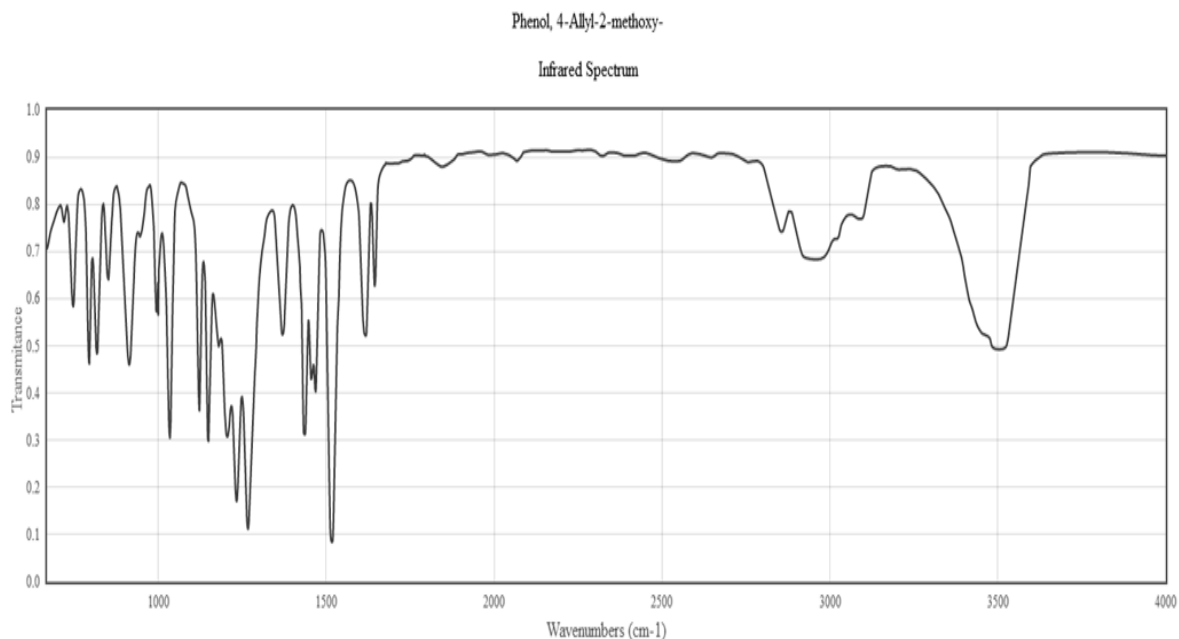


Figura 52-Espectro FTIR do eugenol [46].

Nas Figuras 51 e 52 estão representados os espectros FTIR do ácido benzoico e eugenol, respetivamente. Como se pode constatar, os espectros dos meios de reação para síntese do eugenil benzoato que foram observados resultam da mistura destes dois. A salientar o pequeno pico da ligação C-O-C do eugenol aos 1200cm^{-1} ao lado os dois picos maiores como visto anteriormente e o pico da ligação C=O do ácido benzoico.

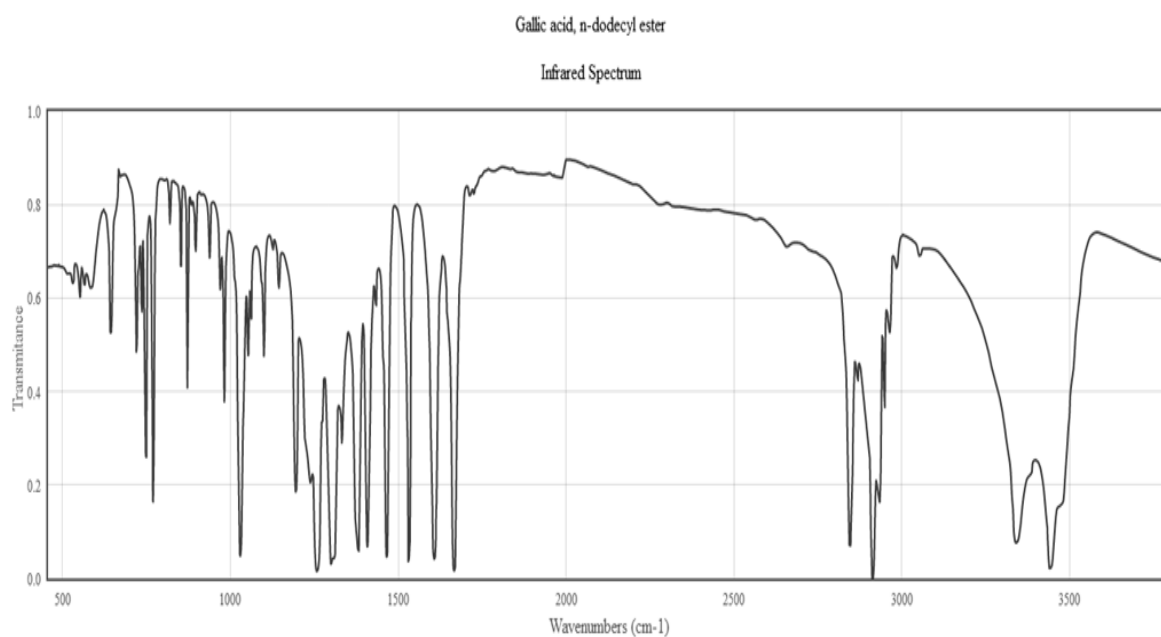


Figura 53-Espectro FTIR do éster lauril galato [46].

Na Figura 50 está o espectro do lauril galato, como se pode ver está presente o pico C-O-C do éster aos 1200cm^{-1} . Na Figura 51 pode-se ver o espectro do ácido gálico, em que o pico da ligação C-O-C está ausente. Esta é a maneira mais simples de distinguir um éster derivado do ácido gálico do próprio ácido gálico.

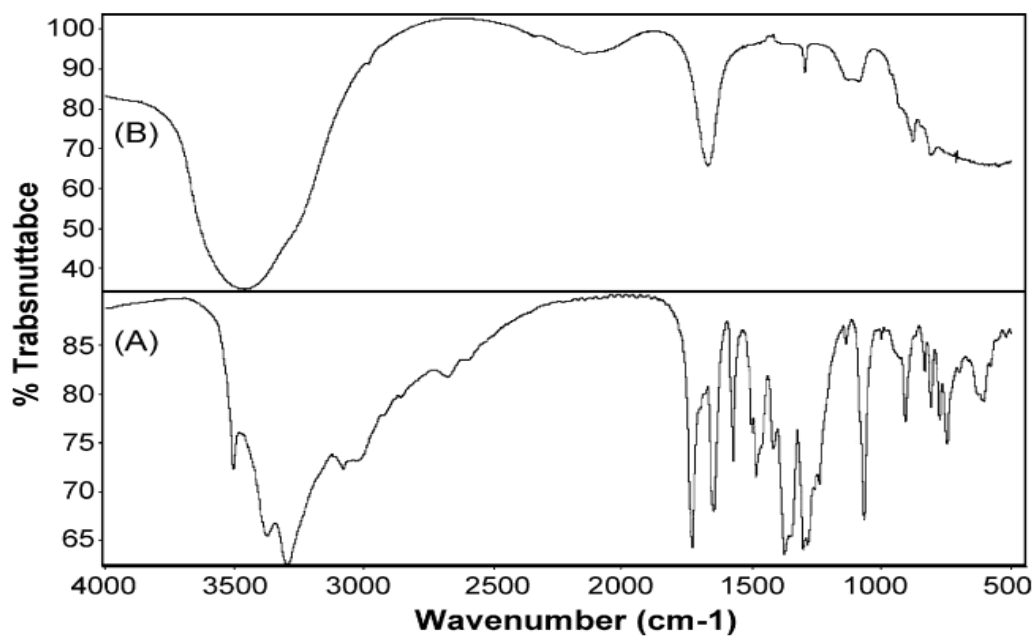


Figura 54-Espectros FTIR do ácido gálico (A) e nanopartículas de ouro (B) [50].

Anexo F- Fotos dos microrreatores, imobilizações e titulações



Figura 55-Microrreatores: Célula de quarto (1cm), frasco de imobilizações e frasco de reações.



Figura 56-CB usada (tirada de frigorífico), CB nova com imobilização, CB nova sem imobilização.

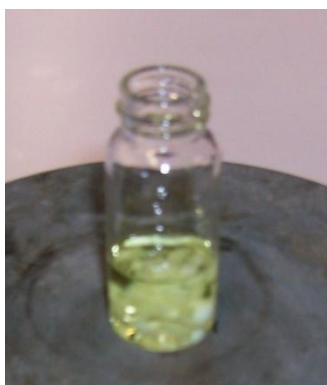


Figura 57-Reação hidrólise *p*-nitrofenil acetato com CALB imobilizada em CB.

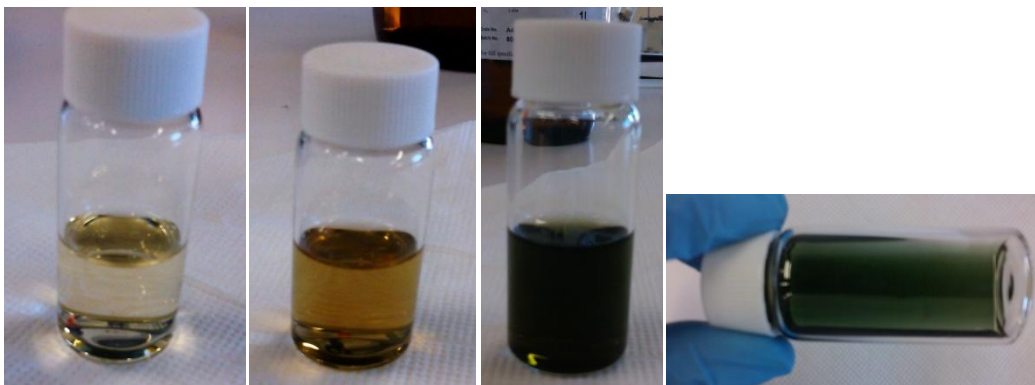


Figura 58-Solução de ácido gálico ao longo da titulação com NaOH até equilíbrio (cor verde).



Figura 59-Solução de propil galato titulada com NaOH no equilíbrio (amarelo), com excesso (laranja).